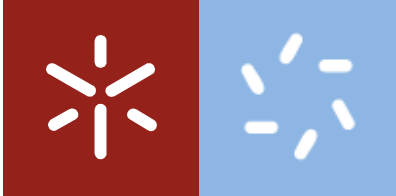




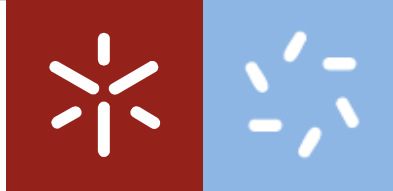
**Deposição não eletrolítica de filmes  
plasmónicos de ouro para biossensores**

Bruno Filipe Pereira da Silva

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências







**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Bruno Filipe Pereira da Silva

**Deposição não eletrolítica de filmes  
plasmónicos de ouro para biossensores**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do

**Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho**

## Anexo 3

### DECLARAÇÃO

Nome

**Bruno Filipe Pereira da Silva**

Endereço electrónico: **brunodasilva.ba@gmail.com** Telefone: **911530805**

Número do Bilhete de Identidade: **13942158**

Título dissertação :

**Deposição não eletrolítica de filmes plasmónicos de ouro para biossensores**

Orientador(es):

**Professor Dr. Paulo José Gomes Coutinho** Ano de conclusão: **2015**

Designação do Mestrado ou do Ramo de Conhecimento do Doutoramento:

**Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

# AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à minha família, por todo o apoio e compreensão e que foram preponderantes na conclusão deste trabalho. Agradeço ainda à minha namorada e companheira, Lígia Ribeiro, que me ajudou imenso na redação do mesmo e esteve sempre disponível para me apoiar durante este período.

# RESUMO

---

A nanotecnologia tem ganho cada vez mais importância nos últimos anos. Cada vez mais, novas aplicações e novos métodos de produção de materiais nanoestruturados têm sido descobertos e creditam-se-lhes um papel de relevo no desenvolvimento tecnológico futuro. Neste contexto, advogam a favor da sua importância, as suas propriedades únicas.

Uma das propriedades, no caso de nanopartículas e nos filmes finos de metais nobres, como é o caso do ouro, é o plasmão de superfície que pode integrar a constituição de biossensores.

O plasmão de superfície consiste numa oscilação coordenada dos eletrões de superfície do metal, provocando alterações nas suas características óticas e eletrónicas.

A sua aplicação em biossensores tem como base estas propriedades que lhes permitem, por exemplo, aumentar o sinal ótico e alterar o ângulo de reflexão quando ligado a uma molécula de reconhecimento, (como enzimas, anticorpos e DNA, por exemplo), ligada por sua vez a uma molécula conhecida.

As técnicas de produção deste tipo de filmes são variadas, sendo que neste trabalho se recorreu à deposição não eletrolítica. Nesta técnica não é utilizada fonte de energia externa e recorre-se a um processo galvânico heterogéneo, onde iões de um metal nobre são reduzidos e depositados numa superfície.

Como vantagens deste processo podemos destacar uma maior simplificação ao nível da produção e uma redução significativa de custos.

O objetivo deste trabalho consiste numa tentativa de otimizar a produção deste tipo de filmes, almejando a sua utilização em biossensores, utilizando substratos de vidro e de mica e vários métodos de funcionalização com diferentes moléculas.

# ABSTRACT

---

The field of nanotechnology has got importance during the last years. The new applications and production methods of the nanostructured materials have been discovered and may have a central role in the technological development that will take place in the future. This importance is due to the particular proprieties they show.

One of these proprieties, in noble metals' nanoparticles and thin films is the surface Plasmon which has many applications in biosensing dispositives area. This phenomenon consists in a coordinated electronic oscillation at the metals' surface and it changes some of the electronics and optical characteristics of material. Its applications in biosensing is based in this particular proprieties, which leads, for instance, to a amplification of an optical signal or the change on the reflection angle when linked to a recognizing molecule (such an enzyme, antibodies or DNA) which is linked to the recognized molecule.

There are many methods through which these films can be produced. In this works, it is utilized the electroless plating. This technique does not need an external power source but a heterogeneous galvanic process in which the metal ions are reduced and deposited into the surface of the substract.

The advantages of this process are simplification of its production and it is a cheaper process when compared to, for instance, electrodeposition. Its application is interesting due to these reasons.

The goals of this work is the optimization of the production conditions of the referred method having in sight its utilization as a biosensor part, utilizing glass and mica substracts also as various methods of funcionalization with silane derivative molecules.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE .....	6
1. BIOSSENSORES .....	9
2. NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	14
3. DEPOSIÇÃO NÃO ELETROLÍTICA .....	22
4. FILMES E PLASMÃO .....	27
5. PLASMA DE OXIGÉNIO .....	30
6. 3-AMINO-PROPIL-TRIETOXI-SILANO / 3-MERCAPTOPROPIL-TRIMETOXI-SILANO.....	32
7. MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
1. Materiais.....	35
2. Produção de nanopartículas de ouro .....	35
3. Limpeza dos substratos.....	35
4. Funcionalização dos substratos.....	36
5. Acoplamento das nanopartículas.....	36
6. Deposição não eletrolítica .....	36
7. Métodos de Caracterização.....	37
8. RESULTADOS.....	38
9. CONCLUSÃO.....	55
10. BIBLIOGRAFIA .....	57





## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**BSA** - Bovine Serum Albumin

**FDA** - Food and Drug Administration

**RPS** - Ressonância do Plasmão de Superfície

**RLPS** - Ressonância Localizada do Plasmão de Superfície

**SERS** - Surface-Enhanced Raman Scattering

**APTMS** - 3-Aminopropil-trietoxi-silano

**MPTMS** - 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano

**TEOS** - tetra-etil-orto-silicato

**COP (Zeonor®)** - Cyclo Olefin Polymer

**SAMS** - Self-Assembled Monolayers

**HRP** - Horseradish Peroxidase

**MFA** - Microscópio de Força Atômica

# 1. BIOSSENSORES

---

A aliança que se tem vindo a estabelecer entre a biotecnologia e a nanotecnologia encontra aplicação numa ampla variedade de áreas e sob formas cada vez mais inovadoras. De fato, estes dois ramos da tecnologia conseguem arranjar o seu espaço em qualquer área científica e assegurar o futuro é, cada vez mais, apoiar as descobertas que são feitas neste sentido.

No caso mais específico da nanotecnologia, o seu interesse maior reside nas propriedades que os materiais adquirem quando se encontram em escala manométrica. O confinamento, adsorção ou ligação covalente de moléculas de interesse em estrutura de tamanho tão reduzido torna-as ótimos sistemas de *drug delivery*, e podemos enumerar como vantagens óbvias o controlo da concentração local de fármacos, a proteção dos mesmos e o aumento da capacidade de ultrapassar obstáculos como barreiras epiteliais e membranas biológicas.

Num sistema inspirado na biologia celular, nanopartículas de ouro foram modificadas com BSA e conjugadas com vários péptidos de modo a terem diferentes alvos dentro da célula e a conseguirem ultrapassar a membrana biológica. Várias nanopartículas têm sido aplicadas como bio-marcadores-alvo e transportadores de drogas em tumores. Nanopartículas híbridas de prata com moléculas anfífilas ramificadas têm exibido propriedades antimicrobianas sendo utilizadas como drogas (Katz e Willner, 2004).

As propriedades físicas que estas exibem dependem das condições de fronteira, de confinamento eletrónico e do rácio superfície-volume, bastante elevado. A configuração da fronteira apresenta um papel preponderante, podendo determinar se uma substância é ou não libertada, por exemplo (Abu-Salah *et al*, 2010). Deste modo, é imperativa a necessidade de compreender a física fundamental que dita as especificidades das relações entre todas as variáveis anteriormente invocadas (Katz e Willner, 2004).

Desta forma, abre-se a possibilidade ao desenvolvimento de nanomateriais híbridos com capacidades catalíticas e de reconhecimento de biomoléculas, como enzimas e DNA com as propriedades fotónicas, eletrónicas e catalíticas interessantes. Estas podem ser utilizadas sozinhas ou conjugadas com nanopartículas e outros materiais como *nanorods* ou nanotubos de carbono (Katz e Willner, 2004).

É de destacar nanomateriais compostos por metais nobres, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, *quantum dots* e nanopartículas de óxidos metálicos que, por estarem na interface entre a detecção biológica e as ciências dos materiais, tem sido intensamente estudados (Abu-Salah *et al*, 2010). Por exemplo, materiais como os metais nobres sofrem alterações grandes devido a pequenas alterações do meio que os rodeia (Tauran *et al*, 2013).

Segundo Grieshaber *et al*, e conforme sintetizado na imagem 1, um biossensor típico deve ser composto por biorrecetores específicos que se ligam ao analito; uma interface onde o reconhecimento ocorre e que é capaz de, devido à sua ligação com o bioreceptor, transformar a alteração que ocorre no biorrecetor, num sinal; um elemento transdutor, que recebe este sinal e o traduz num sinal eletrónico e o amplifica; um *software* capaz de traduzir este sinal num parâmetro definido e com significado físico; por último, uma interface com o operador.

É precisamente no segundo ponto que os materiais nanoestruturados podem proporcionar um avanço tecnológico significativo. (Grieshaber *et al*, 2008)

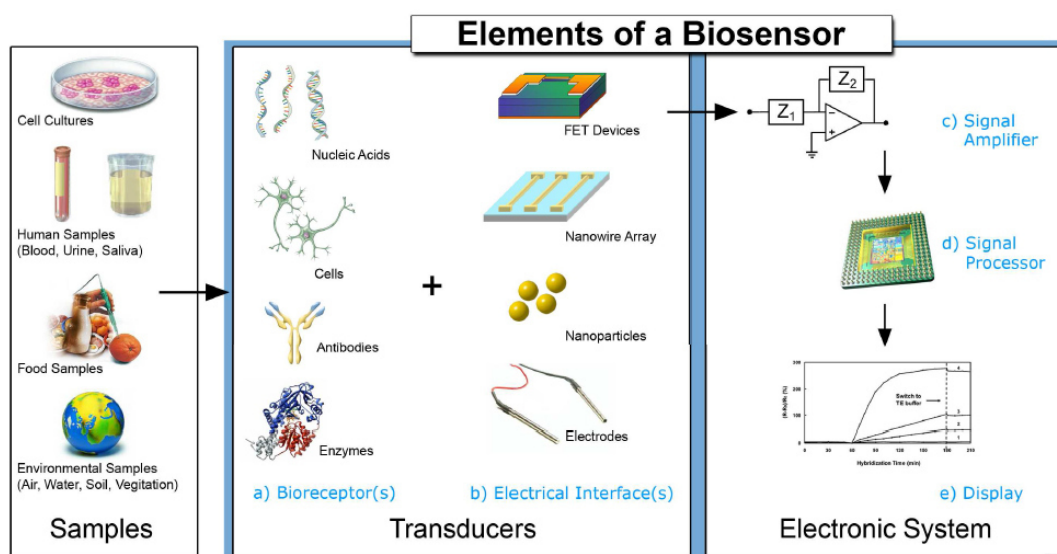


Imagem 1: Constituintes de um biossensor (Grieshaber *et al*, 2008)

Quando se trata de materiais metálicos nanoestruturados devemos ter em conta as suas capacidades únicas a nível da transmissão de sinais, quer elétricos quer óticos, e que podem experimentar alterações quando ligados a determinadas moléculas ou complexos moleculares. Muitas biomoléculas tornam-se desta forma especificamente úteis para o reconhecimento, transporte e na catálise de outras moléculas, com elevado grau de especificidade (Katz e Willner,

2004). Para além da especificidade, uma outra vantagem surge com a aplicação dos biossensores: a diminuição do tempo de resposta (Putzbach e Ronkainen, 2013).

Suportes como as nanopartículas ou os filmes finos são ideais para auxiliar as interações biológicas de reconhecimento tais como antígeno-anticorpo, ácido nucleico-DNA e hormona-recetor, já que estes apresentam dimensões comparáveis às biomoléculas referidas, o que garante a sua compatibilidade. É esta que torna possível a construção de dispositivos através de processos de *self-assembly*. O papel das nanopartículas passa por avaliar as interações às quais se encontram acopladas e transformá-las em sinais mesuráveis e definidos, acabando por funcionar como um amplificador de bio-eventos. A deteção das interações faz-se recorrendo a fenómenos de condutividade elétrica, transduções piezoelétricas ou fotoeletroquímicas. Neste aspeto, é de primordial importância adequar a nossa escolha, optando pelo que eleva o grau de fiabilidade, para poder ser assim utilizado no diagnóstico ou como iniciador de outros processos.

Com base no anteriormente referido, é natural que os biossensores encontrem aplicabilidade no âmbito da medicina, a nível do diagnóstico mas também do tratamento. Este reconhecimento promoveu um desenvolvimento de conhecimentos nesta área, e neste momento é possível analisar em paralelo os vários componentes da amostra e separando-os por intermédio de nanopartículas magnéticas. (Katz e Willner, 2004). Exemplificando, a identificação de determinada sequência genómica que se traduza em determinada doença ou característica de risco poderá ser detetada rapidamente através de uma pequena amostra de DNA (Abu-Salah *et al*, 2010).

Tendo por base os avanços e progressos levados a cabo nos últimos anos, crê-se que, brevemente, será possível a utilização de biossensores para deteção de doenças infecciosas, monitorização da cinética de drogas, deteção de marcadores celulares característicos de determinados tipos de cancro e outras doenças, análise de amostras de urina e sangue para deteção de drogas ou outras substâncias possivelmente causadoras de doenças além da própria monitorização de patógenos nos produtos alimentares (Abu-Salah *et al*, 2010).

No entanto, somos confrontados com alguns entraves no que diz respeito ao uso destes materiais metálicos, como a sua própria produção. Na elaboração de estruturas muito pequenas podemos encontrar alguma dificuldade que costuma ser resolvida pelo método da litografia por feixe de eletrões. Esta técnica, no entanto, apenas pode ser aplicada para objetos até 50nm.

De forma a contornar este obstáculo, quando se pretende construir objetos químicos de menores dimensões, a estratégia passa por utilizar moléculas como unidades numa construção

*bottom-up*. Para tal, as nanopartículas metálicas (Au, Ag, Pt, Cu) e os semicondutores (PbS, Ag<sub>2</sub>S, CdS, CdSe, TiO<sub>2</sub>) parecem ser ideais dadas as suas propriedades elétricas únicas, características óticas e foto-físicas, absorvância controlada do plasmão e fluorescência, que no seu conjunto torna estes materiais indicados para a produção de sinais eletromagnéticos e eletrónicos. (Katz e Willner, 2004)

A combinação destas técnicas permite arquitetar em 2D e 3D. Neste sentido, as nanopartículas têm sido funcionalizadas com unidades moleculares e biomoleculares, dando origem a sistemas híbridos complexos. Quando depositados em camadas ou agregadas, estas nanopartículas funcionalizadas, que estabelecem ligações cruzadas entre si e que se encontram acopladas a superfícies, permitem a deteção de substratos específicos, eletroluminescência adaptável e foto-eletróquímica ampliada. Esta metodologia possibilitou também a construção de dispositivos em escala nano, como por exemplo, transístores de apenas um eletrão, interruptores moleculares e capacitores metal-isolador-nanopartículas- isolador-metal (Shipway *et al*, 2000).

A utilização de enzimas catalíticas permite um maior controlo sobre a estrutura e morfologia dos complexos nanopartículas-biomolécula. A funcionalização de nanopartículas com biomoléculas de grande afinidade e complementaridade pode ser entendida como uma valiosa estratégia de *self-assembly* de estruturas mais complexas e de crescimento multidirecional no caso das moléculas com vários locais de ligação. No âmbito desta última, a engenharia genética amplifica as possibilidades de aplicação e permite obter um crescimento multidirecional mas altamente controlado e subjugadas às regras impostas pelo utilizador (Katz e Willner, 2004).

Nanoestruturas unidimensionais têm vindo a fazer parte de nanodispositivos elétricos, como *nanowires*, *nanorods*, *nanobelts* e nanotubos, com dimensões laterais entre 1e 100 nm. Por um lado, estas estruturas podem ser produzidas em quantidades significativas segundo diversos métodos físicos e químicos. Por outro lado, têm sido descobertas propriedades singulares associados a este tipo de nanoestruturas (térmicas, mecânicas, eletrónicas, oticoelétricas, óticas, óticas não lineares e de emissão de campo) (Xia *et al*, 2003).

A imobilização de moléculas biológicas em matrizes de polímeros é possível de concretizar com recurso a uma grande variedade de técnicas, que incluem a adsorção física, ligações eletroestáticas, reconhecimento específico e ligações covalentes. Estes suportes são sujeitos a modificações com outras moléculas de interesse como proteínas, enzimas, antígenos, anticorpos, DNA e oligonucleótidos e conta com numerosas aplicações biotecnológicas como a

separação por afinidade, biossensores, biorreatores e construção de células de *biofuel*. (Hermanson *et al*, 1992)

Trabalhos mais recentes colocam estas técnicas ao serviço da funcionalização de suportes de tamanho macro para juntar biomoléculas e nanopartículas (Katz e Willner, 2004). O caso particular das nanopartículas e filmes de ouro será explorado mais adiante neste trabalho.

## 2. NANOPARTÍCULAS DE OURO

---

A nanotecnologia assume um papel de extrema relevância na sociedade científica atual. Apesar de ser considerada um ramo da ciência bastante sofisticado e moderno, é relevante referir que as suas raízes emergem, dentro do contexto histórico, por volta do período romano (Tauran, 2013).

Os registos encontrados e que datam esta altura referem a utilização de soluções coloidais de ouro na coloração de materiais em vidro. Como exemplo desta técnica, podemos invocar o famoso *Cálice de Lycurgus*, e que, segundo o apurado, foi feito no séc. IV d.C. (Feldheim e Foss, 2003).

Foram ainda recolhidos documentos pertencentes ao século IX d.C., que reportam a utilização de nanopartículas de cobre e de prata na Mesopotâmia, com o intuito de conferir um brilho metálico às peças de cerâmica (Tauran, 2013). De uma perspetiva evolutiva, o uso das nanopartículas cingia-se, inicialmente, às questões relacionadas com a estética e o embelezamento de materiais. No entanto, as potencialidades deste recurso foram transportadas para outros campos, bem mais ambiciosos, e reconhece-se a Índia como o país que, pioneiramente, colocou as nanopartículas ao dispor da medicina. (Tauran, 2013).

Na idade moderna, durante os séculos XVI e XVII registaram-se novamente diversos avanços tecnológicos neste campo. Cassius e Kunckel procuraram melhorar as práticas de coloração de vidro por nanopartículas (Feldheim e Foss, 2003), e Herschel desenvolveu o processo fotográfico recorrendo aos colóides de ouro (Tauran, 2013). Estes marcaram o início de uma investigação mais aprofundada e abrangente acerca dos métodos que haviam desenvolvido.

Apesar da intensificação dos estudos e trabalhos levados a cabo, é só em meados do século XIX, mais precisamente no ano de 1857, que Faraday consegue explicar e caracterizar de forma objetiva as propriedades óticas das nanopartículas, estabelecendo assim os conhecimentos basilares que possibilitaram o denso desenvolvimento de conhecimento nesta área (Tauran, 2013).

Assim, posteriormente, foi possível relacionar as variações de cor exibidas pelas nanopartículas com o seu tamanho, e que as suas propriedades são extremamente sensíveis às condições ambientais, o que se revelou promissor no que diz respeito às técnicas de reconhecimento molecular (Tauran, 2013).



As nanopartículas metálicas caracterizam-se por serem agregados de metais nobres, no estado de valência 0, e são produzidas através metodologias diversas. Distinguem-se assim, os métodos químicos e os métodos físicos. Dentro da primeira categoria podemos enumerar a redução química, fotoquímica, co-precipitação, decomposição térmica e hidrólise e na segunda categoria inclui-se deposição de vapor, ablação por laser e moagem.

De entre todos os processos referidos, destaca-se a redução química, sendo o mais utilizado. Processa-se em solução, na presença de um sal metálico e de um agente de *capping* ou estabilizador, de forma a evitar a agregação ou oxidação (Tauran, 2013).

Tomando como exemplo a produção de nanopartículas de ouro, a redução química pode ser conseguida segundo dois métodos diferentes e ambos bastante difundidos: o método de *Turkevich* e o método de *Brust-Schiffrin*. São respetivamente utilizados para síntese em meio aquoso e em solvente orgânico.

No primeiro método, cloreto de ouro é inicialmente dissolvido em água, posteriormente aquecida até ferver. Neste ponto, acrescenta-se citrato de sódio. Isto leva a que o sal de ouro seja reduzido, formando núcleos de ouro, com uma gama de tamanhos entre os 15 e os 150 nm e com um pequeno revestimento de citrato. Este método não é muito estável em soluções alcalinas e é necessário uma funcionalização para que possa ter aplicações biológicas (Mieszawska, 2013).

Por seu lado, no método *Brust-Schiffrin*, o sal de ouro é transferido, da água para o tolueno, por transferência química de fase. Um elemento com enxofre, como por exemplo o dodecanetiol é adicionado como ligante de *capping*. Quando adicionado o borohidreto de sódio, o ouro será reduzido e as nanopartículas são formadas. Estas são extremamente estáveis, com tamanhos compreendidos entre 1 e 5nm e são solúveis em solventes não polares. Para que estas possam ser utilizadas em sistemas biológicos, também é necessária uma mudança de ligante ou uma funcionalização adicional com lípidos ou polímeros anfifílicos (Mieszawska, 2013).

É importante referir a existência de outros métodos sintéticos e biológicos que culminam na produção de nanopartículas. O primeiro faz uso de radiação ultravioleta ou micro-ondas, e o segundo recorre a micro-organismos ou extratos de plantas como ajudantes na produção de nanopartículas metálicas. São também denominadas de sínteses verdes.

Variações introduzidas nos processos determinam, logicamente, a obtenção de partículas com diferentes características (Mieszawska, 2013).

Estes procedimentos químicos em solução podem ser feitos em contacto com superfícies funcionalizadas com moléculas ligantes, funcionando como intermediárias na formação dos *clusters* de átomos do elemento a depositar. Estas moléculas ligam-se a esses clusters e evitam a agregação das partículas num material em estado *bulk* e controla o tamanho das nanopartículas que se pretende produzir. Sistemas capazes de dar ao operador um controlo sobre o tamanho dos *clusters* são de vários tipos: monocamadas hidrofóbicas, monocamadas carregadas negativa ou positivamente e camadas de polímeros. Se associarmos às nanopartículas outras moléculas, podemos obter funcionalidades químicas que resultam num sistema capaz de reconhecer, ou ter afinidade com diferentes moléculas, e assim ditar a estrutura e a agregação destas mesmas partículas. Neste momento, as nanopartículas ganham algumas propriedades devido a interações com esses agentes de *capping*, transferência de eletrões ou condutividade.(Katz e Willner, 2004).

Isto é extremamente importante uma vez que um dos principais objetivos da produção de nanopartículas é obter um total controlo do tamanho, forma, propriedades de superfície e propriedades óticas das mesmas, de forma a se conseguir um maior grau de homogeneidade e manipula-las de acordo com as especificidades da sua aplicação. Exemplificando, a absorvância das nanopartículas de ouro é bastante maior do que no estado *bulk*, e este pode ser alterado da zona do visível até ao *near-Infrared* procedendo apenas à modificando do seu tamanho e morfologia. Na sequência desta possibilidade, é-lhes creditado um enorme potencial no campo do diagnóstico médico, já que o tecido biológico tem pouca absorção a estes comprimentos de onda (Mieszawska, 2013).

Tal como foi supracitado, todas as propriedades que os diferentes tipos de nanopartículas apresentam resultam de distintos processos de produção e são determinantes no contexto da sua aplicação. Assim, as nanopartículas podem assumir variadas morfologias. Podem ser cúbicas, hexagonais, *nanorods* ou esféricas, sendo esta a forma mais comum. Algumas destas formas, devido às suas extremidades afiadas e pontiagudas, são conhecidas por aumentarem o campo electromagnético. Por exemplo, as nanopartículas com superfícies espidadas ou com arestas, em forma de estrelas ou *nanorods*, podem ser usadas em *surface enhanced Raman spectroscopy* (Mieszawska, 2013). A moldagem destas partículas de acordo com o desejado é controlada pelo agente redutor, pelo agente de *capping* e, obviamente, pelas condições da reação (Tauran, 2013).

As nanopartículas de materiais nobres, e as nanopartículas de ouro em particular, possuem propriedades especiais que as tornam uma excelente base para dispositivos de aplicações médicas a nível da imagiologia, de sistemas de diagnóstico e ainda de processos terapêuticos (Mieszawska, 2013).

Outra propriedade das nanopartículas, tão útil quanto peculiar é a sua interação com a luz, como comprova as cores intensas e brilhantes exibidas pelos seus coloides (Tauran, 2013). Esta foi completamente explicadas por Mie, quando apresentou a resolução das equações de Maxwell para a esfera e descreveu o espectro de extinção de esferas de tamanhos arbitrários (Feldheim e Foss, 2003).

Na presença de um campo electromagnético oscilatório de luz, a banda de eletrões livres sofre uma oscilação coletiva e coerente. Este movimento é ressonante a uma frequência particular e é chamada de oscilação localizada e ressonante do plasmão de superfície. A oscilação ressonante do plasmão pode decair por radiação da sua energia, resultando em dispersão de luz, ou então pode decair de forma não-radiativa transformando a energia em calor.

Na frequência relativa à ressonância plasmão, características como a intensidade do campo elétrico, dispersão e absorção tornam-se mais fortes. Para o caso do ouro, prata e cobre, esta frequência situa-se na gama do visível (Tauran, 2013).

Desta forma, a dispersão ótica que se verifica determina a sua utilização em diversos tipos de microscopia, e por conseguinte, têm sido utilizadas na obtenção de imagens por tomografia computadorizada e como adjuvantes nos eventos de radioterapia. Por exemplo, o ouro é capaz de atuar como atenuador de sinais raio X (Mieszawska, 2013).

Além disso, quando as nanopartículas deste mesmo metal absorvem a luz, regista-se um incremento da sua temperatura, o que as torna importantes agentes para o contraste em *photoacoustic imaging* ou para terapia foto-térmica (Mieszawska, 2013).

O fenómeno que possibilita todas estas aplicações das nanopartículas, a ressonância do plasmão de superfície, depende, obviamente, de diversos parâmetros: o seu tamanho, geometria e as propriedades físicas do meio no qual estas estão dispersas. Por exemplo, em água, a absorção de nanopartículas de cobre, prata e ouro com tamanhos compreendidos entre 3 e 80nm têm um pico bem definido a 400, 520 e 570nm (Tauran, 2013).

Relativamente às propriedades elétricas deste tipo de partículas, com dimensões superiores a 2nm de diâmetro, verifica-se que estas correspondem às do material em estado *bulk*. Assim, o transporte de eletrões percorre níveis contínuos de energia, e não níveis discretos.

Tanto a carga superficial como o transporte dos elétrons pode ser entendido com as equações clássicas para diagramas de circuitos eletrônicos resistência/condensador. De uma forma geral, para descobrirmos as propriedades eletrônicas das nanopartículas metálicas apenas necessitamos de saber o seu tamanho e a constante dielétrica do meio envolvente.

Ainda assim, a carga superficial assim como o transporte de elétrons pode ser entendido com as equações clássicas para diagramas de circuitos eletrônicos resistência/capacitador. Pelo contrário, as propriedades elétricas de nanopartículas de semicondutores cujo transporte de elétrons só pode ser explicado por uma descrição mecânica quântica. Esta particularidade capacita as partículas a integrarem sensores elétricos e *chips* (Tauran, 2013).

Com base nos aspetos mencionados e na possibilidade de sujeitar as nanopartículas a modificações, por intermédio do *coating*, estas são consideradas ótimas para a deteção de moléculas como drogas ou mesmo de células com determinados marcadores químicos superficiais (Mieszawska, 2013) e particularmente apelativas para constituírem sistemas antimicrobianos. Esta capacidade de reconhecimento deve-se à extrema sensibilidade das mesmas face a determinados comprimentos de onda, à intensidade do plasmão de ressonância e ao seu estado de agregação (Tauran, 2013).

Estes podem ser agrupados, segundo Willner, em três grandes tipos. São eles a adsorção eletroestática, a adsorção química e os métodos baseados na afinidade. (Katz e Willner, 2004)

A adsorção eletroestática consiste na adsorção moléculas carregadas positivamente nas nanopartículas estabilizadas com ligandos de carga negativa como, por exemplo, citrato e ascorbato (derivados de ácidos carboxílicos). Este é particularmente usado em trabalhos com proteínas e encontra-se em vigor desde 1971 devido ao contributo de Faulk e Taylor. Apesar de ser bastante simples e fácil de se pôr em prática, este é bastante sensível a flutuações ambientais, como o pH e a força iónica. O leque de opções para moléculas funcionalizantes também é bastante restrito (Tauran, 2013).

Quanto à adsorção química, esta é conseguida tirando partido da grande afinidade que os metais nobres têm com os grupos de enxofre. A preparação de ácidos nucleicos com grupos de enxofre “pendentes” através de síntese de fase sólida ajuda a sua ligação a nanopartículas metálicas. Na verdade, os ácidos nucleicos, depois das proteínas, são as biomoléculas mais estudadas e usadas para *capping* de nanopartículas de metais. Tem a vantagem, assim como a funcionalização com base na afinidade, de ser uma técnica robusta e que permite a orientação

das moléculas à superfície das nanopartículas. Ambas partilham também a desvantagem de exigirem, em grande parte das situações, uma modificação destas mesmas moléculas (Tauran, 2013).

As ligações covalentes podem também ser conseguidas através de um ligante bifuncional, que funcionará como âncora entre a molécula de interesse e a nanopartícula. Este tipo de funcionalização depende de um processo bifásico. Primeiro procede-se à ativação, que envolve a formação de uma camada na superfície das nanopartículas e que servirá de âncora, expondo grupos funcionais aos quais as moléculas biológicas se podem ligar covalentemente. O segundo passo passa pela funcionalização, onde as referidas biomoléculas são ligadas criando, deste modo, sistemas de reconhecimento. A molécula interveniente na funcionalização é, geralmente, bastante específica e providencia um local de grande afinidade para a molécula que se vai ligar.

Normalmente, este tipo de técnica é utilizada na ligação específica de proteínas e oligonucleótidos. As proteínas são largamente usadas na funcionalização de nanopartículas devido à sua grande versatilidade e importância biológica. Neste âmbito, é de referir que as nanopartículas de ouro podem ser funcionalizadas com streptavidina que desencadeia a ligação, por afinidade, de proteínas (como imunoglobulinas e albuminas do soro) ou oligonucleótidos, ambos ligados a biotina (Tauran, 2013).

Estas nanopartículas também podem ser encapsuladas em lipossomas com uma maior capacidade de transporte, que podem mobilizar moléculas terapêuticas ou melhorar técnicas de diagnóstico, transportando, por exemplo, sondas (Mieszawska, 2013).

Esta versatilidade das nanopartículas de ouro alargou as suas aplicações às áreas biomédicas e destaca-se a crescente importância que tem vindo a assumir na área dos *teragnósticos* (terapia e diagnóstico de forma integrada), dado que estas podem juntar num mesmo processo, através da combinação de várias propriedades, a obtenção de imagem, a marcação de alvos do tratamento e a própria entrega de fármacos para uma determinada patologia. Relativamente às nanopartículas formadas com o isótopo Au-198, estas podem funcionar como radioterapêuticos (Mieszawska, 2013). Algumas práticas foram já aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration) e encontram-se em fase de *clinic trial* e para que o seu uso no domínio das ciências da vida seja viável, é imperativo que averigue a toxicidade inerente a estes sistemas.

Alguns estudos de toxicidade mostram que as características físico-químicas das partículas desempenham um papel muito importante nas interações que estas têm com as células, determinando a sua maleficência ou beneficência. Algumas destas características importantes a ter em conta em nanopartículas híbridas são o tamanho, forma, a química da superfície, a área da superfície, a carga superficial e a própria composição metálica das referidas partículas (Tauran, 2013). Grande parte da literatura defende que, na gama de tamanhos frequentemente utilizada, estas são inertes, biocompatíveis e não tóxicas (Mieszawska, 2013). No entanto também há referências que constatarem que, apesar do ouro em estado *bulk* ser, geralmente, considerado seguro, são necessários mais estudos para examinar a sua biocompatibilidade e impacte ambiental caso as nanopartículas sejam produzidas em larga escala e usadas *in vivo*.

Neste campo, Murphy fez a revisão de alguns estudos assim como de alguns dos parâmetros de toxicidade (Murphy *et al*, 2008).e concluiu que o próprio tipo de células em contacto com as nanopartículas é extremamente preponderante na resposta que ocorrerá. Em certa medida, esta particularidade desvenda novas aplicações que estas podem vir a ter.

Patra estudou a resposta de determinados tipos de células a nanopartículas de ouro e confirmou que estas conseguem induzir a morte celular em linhas celulares A549 de carcinoma pulmonar humano enquanto, por exemplo, em linhas celulares BHK21 de rim de ratinho e HepG2 de carcinoma humano do fígado hepatocelular não houve alterações aparentes. Este facto dá indicação de que as nanopartículas de ouro, *per si*, sejam usadas no tratamento de tipos específicos de carcinoma (Murphy *et al*, 2008).

Como já citado, outro parâmetro capaz de alterar radicalmente a resposta das células às nanopartículas é a sua carga superficial. Observa-se que nanopartículas catiónicas são bastante mais citotóxicas do que nanopartículas aniónicas. Pensa-se que isso poderá ter origem na interação electrostática entre as nanopartículas e a membrana carregada negativamente (Tauran, 2013).

Para além disso, Chithrani e colaboradores também observaram que a capacidade de absorção das nanopartículas está relacionada com o seu tamanho. Este autor afirma que esferas com cerca de 50nm são absorvidas de uma forma mais eficiente quando comparadas com esferas de tamanho diferente, e que na mesma gama de tamanhos, os *nanorods* não são tão bem absorvidos. (Chithrani *et al*, 2006)

O trabalho de Dykman *et al*, acerca da utilização de nanopartículas de ouro *in vivo* permitiu entender que tanto a dose como a própria resposta inflamatória são determinantes para evitarem a acumulação destas nanopartículas em tecido reticuloendotelial como o encontrado no baço e fígado (Dykman *et al*, 2011). Apesar disso, há autores que consideram essencial para o mesmo fim a sua funcionalização, que na sua ótica as torna biocompatíveis e diminui os riscos de acontecer cito-toxicidade (Mieszawska, 2013).

Quando se pretende utilizar estas partículas a nível do sistema nervoso, deve ter-se em atenção a sua capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, que depende muito do seu tamanho, que convém que não se desvie do intervalo de valores compreendido entre 5 e 20nm. Assim, nanopartículas com diâmetros de 1 a 2nm apresentam uma toxicidade muito maior devido à sua capacidade de se ligarem irreversivelmente a biopolímeros das células. Numa gama de tamanhos entre os 3 e os 100nm, estas nanopartículas já não apresentam qualquer nível de cito-toxicidade como comprovam vários estudos *in vitro* (Tauran, 2013).

### 3. DEPOSIÇÃO NÃO ELETROLÍTICA

---

A deposição por métodos não eletrolíticos de metais ou ligas metálicas tem uma importância significativa na produção de novos materiais para aplicações na área da eletrônica (nomeadamente na produção de alguns materiais como circuitos híbridos, módulos de *multichips*, condensadores, resistências e na metalização de *chips* semicondutores) (Baudrand e Bengston, 1995), em materiais resistentes ao uso e à corrosão e ainda dispositivos médicos. Devido a algumas razões de cariz prático, este método de deposição pode ser utilizado para complementar ou até mesmo, nalguns casos, substituir a eletrodeposição.

O processo de deposição não eletrolítico assume ainda um papel relevante na deposição em materiais que contêm com um *design* mais compacto, dado que, de entre os métodos disponíveis, é o que apresenta uma maior eficácia. Uma das características que lhe confere alto grau de fiabilidade é o elevado poder de penetração, que potencia a ocorrência de deposição em substratos de formas irregulares, complexas e que apresentem buracos (Hou et al, 1998). Para além disso, a camada depositada é mais densa (menos porosa) e exhibe melhores propriedades no campo das aplicações eletrônicas e no impedimento da corrosão. Com este procedimento é ainda possível promover a deposição em superfícies não condutoras, como é o caso do vidro, cerâmica e polímeros, e torna-se mais fácil controlar as áreas que se pretendem funcionalizar. Isto porque na deposição não eletrolítica não se verifica a necessidade de aplicar corrente elétrica (Djokic, 2002).

Apesar de todas as vantagens e particularidades do método não eletrolítico anteriormente enunciadas consideram-se ainda necessários novos estudos que visem creditar este método de forma a tornar mais ampla a sua utilização (Baudrand e Bengston, 1995).

Existem, no entanto, técnicas específicas que recorrem já aos aspetos positivos do mesmo, nomeadamente a evaporação térmica ou o *sputtering*, evitando assim a utilização de instrumentos e recursos bem mais dispendiosos.

A deposição não eletrolítica é um método relativamente simples, que ocorre de forma faseada e alterável, permitindo a manipulação dos filmes, aprimorando-se as suas características tendo em conta a sua futura aplicação (Lei et al, 2008). Esta foi descrita pela primeira vez em 1835 por von Liebig na sequência da redução de sais de prata para prata em estado *bulk*, usando aldeídos. Contudo, só mais tarde se considera o início do desenvolvimento deste



processo, com Wurtz, em 1844, quando este constatou que iões  $\text{Ni}^{2+}$  poderiam ser reduzidos por iões hipofosfito, tendo obtido apenas um pó preto.

Apesar das descobertas neste campo serem relativamente prematuras, a sua evolução manteve-se vagarosa até 1946. Foi com Brenner e Riddell que as investigações ganharam novo ânimo. Tinham descoberto, e dado a conhecer nos seus trabalhos, as condições ideais para a deposição de filmes uniformes de níquel a partir de soluções aquosas do mesmo metal e de iões hipofosfito.

Ao longo das últimas décadas, este processo tem sofrido manifestas melhorias devido às aplicações que tem na tecnologia moderna, afetas à área da eletrónica, à proteção contra a corrosão e aplicações biomédicas (Djokic, 2002).

Atualmente, já é possível depositar pelo método não eletrolítico, todos os metais que já eram passíveis de ser depositados pelo método eletroquímico. O sucesso da deposição prende-se com o controlo estreito das condições do trabalho como a composição do banho, o pH, a temperatura e a superfície catalisadora, bem como a escolha adequada dos agentes redutores (Djokic, 2002).

A tabela 1 mostra os metais e as ligas metálicas possíveis de se depositar por esta técnica (Djokic, 2002).

**Tabela 1 - Tipos de metais que podem ser depositados por Deposição não electrolítica (Djokic,2002)**

Metais Simples	Elementos Codepositados com Ni ou Co	Outras ligas
Ni, Co, Cu, Cd, Pb, Sb, Bi, Ag, Au, Pt, Pd, Rh, Ru, Sn, Cr, In	P, B, V, Mo, W, Mn, Re, Fe, Zn, Ti	CuNi, CuCo, CuCd, CuAu, PdNiP, PdCoP, PdZnP, AuAg, AuSn, PbSn, AuIn

Do primeiro grupo, referente à tabela anterior, os metais mais comumente utilizados são o níquel, cobalto, cobre, prata, ouro e paládio. Apesar de existirem estudos bem-sucedidos acerca da deposição dos restantes, estes não possuem uma aplicabilidade relevante. Na segunda coluna, figuram elementos que podem ser depositados conjuntamente com o níquel e o cobalto, de entre os quais se destacam o molibdénio e o tungsténio. Esta forma de deposição é análoga à eletrodeposição descrita por Brenner (Djokic, 2002).

Quanto ao terceiro grupo, este refere-se às principais ligas metálicas depositáveis.

Para além dos dados representados na tabela, é ainda de referir, com base na literatura, a possibilidade de proceder à codeposição de ouro e níquel, tirando vantagem do par galvânico por eles formado.

Uma grande parte das deposições que envolvem mais do que um metal têm como primordial objetivo a deposição de um deles, que é, por sua vez, facilitada pela deposição do outro. Neste sentido, recorre-se ao níquel como facilitador devido à propensão que este apresenta para ser depositado, sendo que existem numerosos trabalhos acerca da deposição desse metal.

Como já foi referido, os primeiros a utilizar o termo *electroless metal deposition* foram Brenner e Riddell referindo-se a um processo autocatalítico de deposição que não incluisse a aplicação de uma corrente elétrica externa (Hou *et al*, 1998). Apesar da definição generalista, este processo engloba três grandes grupos: deposição de substituição, deposição de contacto e deposição autocatalítica. Mas, correntemente, o termo *electroless metal deposition* tem sido mais utilizado para definir a deposição autocatalítica (Djokic, 2002).

É de salientar que esta última é mais amplamente utilizada e baseia-se num método químico para a deposição de filmes metálicos a partir de soluções aquosas, em superfícies cataliticamente ativas, sem a utilização de uma fonte de energia externa e pela redução dos iões metálicos. Para tal, é utilizado um agente redutor forte numa reação química altamente controlada. Esta reação é catalizada pelo metal ou liga que vai ser depositada. O processo pode ser descrito pela seguinte reação:



Este procedimento é mais comumente empregue quando se pretende depositar níquel ou cobre, mas é de salientar que outros metais são também passíveis de serem depositados, como o Au, Ag, Co, Sn, AuSn, NiWP, e que se tornaram foco de múltiplos estudos dada a diversidade de aplicações que podem vir a ter (Djokic, 2002).

Normalmente, todas as soluções utilizadas para a deposição pelo método autocatalítico devem conter compostos específicos e que desempenharão funções determinadas, durante todo decorrer do mesmo. Este deve portanto incluir: uma fonte de iões metálicos a depositar, um agente de complexação, um agente redutor e um estabilizador ou inibidor. (Djokic, 2002).

No respeitante à fonte de iões metálicos, esta pode ser qualquer sal solúvel em água, pelo que se podem incluir nesta categoria os sulfatos, cloritos, acetatos e cianetos. A escolha da fonte prende-se com a natureza do metal a ser depositado, da estabilidade da solução e das

condições em que a reação se desenvolve. Concretizando com o caso da deposição de íons de ouro e prata, utiliza-se frequentemente cianetos, respectivamente  $\text{KAu(CN)}_2$  e  $\text{NaAg(CN)}_2$  (Baudrand e Bengston, 1995), que têm sido, tendencialmente substituídos por outros compostos, como  $\text{KAuCl}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{Au(SO}_3)_2$  e  $\text{AgNO}_3$ , devido à sua elevada toxicidade (Djokic, 2002).

Para agentes de complexação, utilizam-se normalmente ácidos orgânicos ou os seus sais. Estes agentes funcionam como tampão, evitam a precipitação de hidróxidos e de sais e a redução de íons metálicos livres, e influenciam consideravelmente a taxa de redução e as propriedades dos depósitos de metal. Nalguns casos, os agentes em questão conseguem reagir com os contaminantes metálicos e evitar que estes reajam com os agentes redutores (Djokic, 2002).

Voltando novamente ao exemplo prático da deposição de ouro, os agentes de complexação a que se recorre com mais assiduidade são os cianetos, os sulfitos, etanolamina, citratos e os cloretos (Djokic, 2002).

Outra parte crucial para a ocorrência da deposição autocatalítica é a escolha do agente redutor, que deve ter em conta as condições em que vai acontecer a deposição do metal e as características do próprio metal ou liga metálica a ser depositada. Por exemplo, o uso de agentes redutores com fósforo ou boro leva à incorporação inevitável destes elementos, afetando as propriedades dos filmes deste material. Pode então optar-se pelo uso de agentes redutores como a hidrazina ou o formaldeído, que pode resultar na formação de depósitos metálicos puros (Djokic, 2002).

Como referido pelo mesmo autor, a quantidade de íons metálicos utilizada deve ser tida em conta, uma vez que pode competir com o agente redutor na adsorção na superfície metálica que se está a formar. (Djokic, 2002).

A maior parte das deposições não eletrolíticas necessita de um primeiro banho, onde as partículas de ouro são acopladas para servirem de pontos de ancoragem para a camada de ouro que vai ser formada e para evitar contaminação por outros metais como o níquel (Baudrand e Bengston, 1995).

Por último, podem ainda ser utilizados agentes estabilizadores, que evitam que a solução se decomponha, prolongando a sua utilização e evitando que se formem os característicos precipitados de partículas metálicas, que podem catalisar o fenómeno de redução metálica, devido à sua grande área de superfície. Mais uma vez, a escolha do estabilizador depende muito do metal a ser depositado assim como a sua compatibilidade com o processo.

Estes podem ser divididos em diferentes categorias: compostos contendo elementos como o enxofre, selênio e telúrio; compostos contendo oxigênio, como o  $\text{AsO}_2^-$ , o  $\text{IO}_3^-$  e o  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; catiões de metais pesados, como  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}_2^{2+}$  e  $\text{Sb}^{3+}$ ; e por último, ácidos orgânicos insaturados, como o ácido maleico e o ácido itacônico (Djokic, 2002).

É imperativo que a utilização destes estabilizadores seja controlada, com especial enfoque para a sua concentração, sendo esta absolutamente crucial para a maximização da taxa de deposição. Por exemplo, no caso dos primeiros dois grupos referidos de estabilizadores, uma concentração superior a 2ppm pode ser suficiente para que a reação de deposição seja inibida por completo.

No caso da deposição de ouro Kato e os seus colaboradores reportaram que a deposição de ouro na presença de ditizona, hidrocloreto de 1,10-fenatrolina, de N,N-dietilditiocarbaminato de sódio e de compostos mercapto consegue estabilizar a reação de deposição do ouro em solução que não utilize cianeto por mais de 20 horas (Djokic, 2002).

Os trabalhos levados a cabo nos últimos anos permitiram que se registasse um notório melhoramento da técnica de obter filmes a partir de vários metais e ligas, com atenção especial para o ouro.

Verifica-se ainda a existência de trabalhos onde a sílica mesoporosa serve para a produção de nanopartículas de ouro, através da redução de sais metálicos em ambiente confinado e impregnado de sais metálicos (Asefa e Lennox, 2005).

## 4. FILMES E PLASMÃO

---

O ouro apresenta propriedades distintas conforme o estado em que se encontra, ou *bulk* ou filmes finos.

Num estudo pioneiro acerca das perdas de energia por parte dos elétrons rápidos que passam através de filmes finos, Ritchie previu a existência de um estado eletrônico autossustentado coletivo de excitação à superfície do metal (Pitarke *et al*, 2007).

Perante o conhecimento de que os elétrons da banda de condução em filmes finos se comportavam como um gás ideal de Fermi-Dirac e que os elétrons rápidos sofriam pequenas mudanças de energia e momento, Ritchie sugeriu que se aplicasse o modelo hidrodinâmico de *Bloch* (Ritchie, 1957). Neste modelo considera-se que os íons estão fixos espacialmente e distribuídos segundo um modelo probabilístico conhecido. Assim, a resposta dielétrica do plasma é condicionado por duas partes distintas: a interação dos elétrons rápidos que circulam por todo o volume do filme e a perturbação forte provocada pelos íons de maior volume e bastante mais lentos (Ishikawa e Felderhof, 1998).

Quando consideramos um átomo só podemos admitir que as interações ditadas pela lei de Coloumb são bastante pequenas e as alterações da posição dos elétrons faz-se através de níveis de energia singulares. As transições eletrônicas pelos vários níveis, induzidas pela radiação incidente são, por isso, explicadas por transferência de energia para um elétron de valência e de perda de energia por esse mesmo elétron.

Por outro lado, esta interação de Coloumb num sólido, é capaz de provocar oscilações coletivas de alta frequência. Quando uma partícula rápida é capaz de excitar estas oscilações, passamos a falar de perda de energia associada coletiva (Pines, 1956).

No entanto, já anteriormente tinha sido referido por Pines and Bohm, que a natureza da interação descrita por Coloumb entre os elétrons de valência de metais para distâncias mais alargadas, provoca oscilações de plasma semelhantes às oscilações dos elétrons em gases provocadas por descargas elétricas, descritas por Langmuir e Tonks (Pitarke *et al*, 2007).

Estes autores afirmam que as flutuações da densidade dos elétrons têm a contribuição de dois componentes: um aleatório, que corresponde ao movimento térmico dos elétrons considerados individualmente e um outro movimento coerente oscilatório, com frequência característica, denominada de oscilação de plasma. (Pines e Bohm, 1952). Esta oscilação, primeiramente observada em gases, foi encontrada em filmes finos. Pines considerou que esta

aplicação da lei de Coloumb entre elétrons de valência influencia o espectro de excitação do sistema e, conseqüentemente torna possível a passagem de oscilações coletivas de altas frequências ao longo do filme. O termo plasmão é assim introduzido para definir o *quantum* de excitação elementar associado a este movimento coletivo de alta frequência (Pines, 1956).

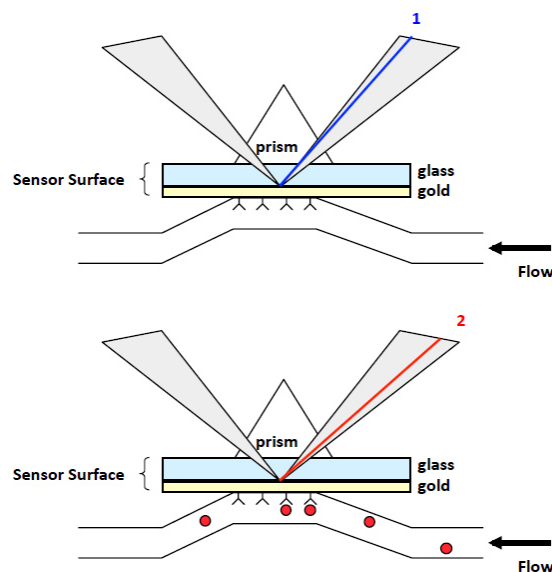
Powell e Swan, em alguns ensaios sobre a perda de energia dos elétrons, demonstraram a existência desse estado de excitação coletivo. Ao *quanta* desses estados, Stern e Ferrel chamaram de plasmão de superfície (Pitarke *et al*, 2007). Este plasmão de superfície é diferente do plasmão localizado. Enquanto que o plasmão de superfície é característico de filmes finos, o plasmão localizado é caraterístico de nanopartículas. O plasmão de superfície é visível em espectroscopia por uma banda de absorção intensa e bem definida a cerca de 500nm (Lindberg *et al*,1995).

A excitação do plasmão de superfície leva, por sua vez, ao aumento do campo magnético na vizinhança do filme metálico, propriedade que tem sido explorado na construção de biossensores baseados na Ressonância do Plasmão de Superfície (RPS), na Ressonância Localizada do Plasmão de Superfície (RLPS) e em *Surface-Enhanced Raman Scattering* (SERS). (Dhawan,2011).

A tecnologia de sensores baseados na ressonância do plasmão de superfície tem sido comercializada por várias empresas (Homola *et al*, 1999) e tem estado na vanguarda no campo de observação em tempo real de interações moleculares em interfaces liquido-sólido. (Wang *et al*, 2005).

Geralmente um sensor ótico deste tipo (Imagem 2) compreende um sistema ótico, um meio de transdução que liga ambos os domínios ótico e bioquímico e um sistema eletrônico que suporta os componentes ótico-eletrônico permitindo o processamento da informação. O meio de transdução transforma diferenças de interesse em diferenças no índice de refração e que podem ser numericamente determinadas. A parte ótica do sensor contém uma fonte de radiação e uma estrutura ótica, onde o plasmão superficial é excitado e analisado. Neste processo é gerado e processado um sinal elétrico (Homola *et al*, 1999).

Nos dispositivos sensores baseados na ressonância do plasmão de superfície, são, normalmente utilizados acopladores em forma de prisma, sendo os mais comuns os de vidro ótico. O material é escolhido de acordo com o índice de refração do analito que vai ser coberto pelo sensor. Quanto maior foi o índice de refração do analito, também maior índice de refração deverá ter o material utilizado. (Homola *et al*, 1999)



**Imagem 2: Biossensor ótico, seus componentes e alteração do ângulo de reflexão da luz incidente devido à interação entre a molécula recetora e a molécula reconhecida. (Altschuh, 2009).**

Um biossensor destina-se, por norma, a explorar as interações antígeno-anticorpo, recetor-ligando e hormona-recetor. De um modo geral, as ligações que acontecem diretamente com a superfície metálica não são as melhores uma vez que são ligações não específicas. Assim, várias soluções químicas têm sido utilizadas para melhorar este aspeto, sendo que a mais comum é a cobertura com uma monocamada de streptavidina imobilizada sob o filme de ouro (que normalmente tem uma espessura ótima entre 45-60nm) com biotina (Wang *et al*, 2005).

A superfície do ouro pode também ser funcionalizada com lipossomas devido ao carácter hidrofóbico da superfície. Pode ainda ser funcionalizada com uma monocamada auto-montada (SAM) de moléculas com grupos tiol o que proporciona bons grupos ligantes para outras moléculas, possibilitando a formação de uma monocamada compacta (Homola *et al*, 1999).

## 5. PLASMA DE OXIGÉNIO

---

A matéria pode apresentar-se sob diferentes estados físicos, definidos de acordo com o tipo de moléculas e o seu padrão organizacional. Caso seja aplicada sobre a matéria energia constante é possível fazê-la alterar o seu estado físico, dado que o aumento da energia fornecida implica um aumento da entropia do sistema.

Desta forma, e por ordem crescente de energia fornecida é possível que a matéria passe do estado sólido para o estado líquido, e deste para o estado gasoso. Contudo, caso a energia fornecida continue a aumentar é possível fazer a matéria assumir o estado físico de plasma, também conhecido por quarto estado físico da matéria caracterizado pela obtenção de fragmentos atômicos como eletrões, iões carregados positivamente e radicais livres.

Na natureza, o plasma ocorre em diversas situações, como é o caso dos trovões, aurora boreal, nas chamas e no Sol, mas é possível obter o quarto estado da matéria de forma artificial, como na soldagem de materiais. O plasma conta com diversas aplicações no quotidiano, como nas luzes de néon e *flashlights*. (Manual Diener Electronics, 2007)

No presente trabalho o plasma foi gerado a baixas pressões, através de uma descarga eléctrica, numa câmara de vácuo, onde se injetou oxigénio. A utilização de uma câmara de vácuo permitiu alcançar pressões na ordem dos 0,1 mBar. (Manual Diener Electronics, 2007)

As aplicações no tratamento de superfícies do plasma podem ser agrupadas em 3 categorias distintas, com base na sua interação com os substratos. Desta forma, pode haver interação por efeito mecânico, onde o substrato é limpo por efeito “tempestade de areia” causado pelas partículas energizadas de gás; por efeito químico, que resulta da reação dos radicais livre e iões com os contaminantes da superfície; e por último, através dos efeitos da radiação, originada no processo de ionização do gás, e que quebra as cadeias de carbono de contaminantes.

Em todos estes processos, parte dos radicais livre do plasma permanecem acoplados à superfície do substrato, o que contribui para a funcionalização do mesmo. (Manual Diener Electronics, 2007)

A acrescentar à capacidade de limpeza de superfícies, o plasma é também utilizado para promover alterações das características das mesmas, como por exemplo, alterar a sua interação com as moléculas de água, bem como a energia de adesão. Portanto, diversos autores



defendem que as propriedades do plasma terão uma importância fundamental no âmbito da medicina e da biologia, bem como na indústria alimentar (Shun'ko e Belkin, 2007).

## 6. 3-AMINO-PROPIL-TRIETOXI-SILANO / 3-MERCAPTOPROPIL-TRIMETOXI-SILANO

---

Um dos pontos fulcrais no processo de formação de filmes de ouro passa pela criação de pontos de ancoragem, que funcionem como centros a partir dos quais os filmes vão “crescer”. Para tal, é necessário aprimorar as questões relacionadas com a funcionalização dos substratos, como o vidro ou a mica, sendo esta etapa extremamente importante. Reportando ao presente trabalho, foram utilizadas neste procedimento duas moléculas distintas: 3-Aminopropil-trietoxi-silano (APTMS) e o 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano (MPTMS).

O 3-Amino-propil-trietoxi-silano (APTMS) é uma molécula com um átomo de sílica como núcleo central, e grupos substituintes  $\text{H}_3\text{CO}$ , que lhe confere facilidade em ligar-se a substratos de vidro. Possui ainda um grupo amina, que aumenta a sua capacidade de se ligar a outros tipos de moléculas. Assim, a interação entre o APTMS e o substrato origina um derivado de vidro com aminopropil. A sua utilização é frequente em processos de *coating* de substratos de vidro dada a facilidade em se acoplar a uma grande variedade de moléculas, na preparação de *slides* carregados positivamente, úteis em imunohistoquímica, e hibridização *in situ*. Também tem vindo a ser utilizado para dopar *slides* de vidro com nanopartículas, com valores mínimos de agregação e de ligação não específica com biomoléculas.

O APTMS também é muito utilizado no *coating* de nanopartículas de sílica em conjunto com tetra-etil-orto-silicato (TEOS).

Quanto ao APTMS, a sua versatilidade face a questões de adsorção aos substratos não se resume apenas a compostos químicos. Citando o trabalho prático levado a cabo por Wu e colaboradores, o APTMS pode ser utilizado em diversos campos das Ciências da Vida, como por exemplo, estudo de linhagens celulares. Para tal, recorreram ao APTMS para fazer o *coating* de um fio de polisilício. Este, se integrado num molde de poli-dimetil-siloxano e confinado a uma pequena janela, poderá servir de suporte a uma única célula cancerígena viva, já que a área *coated* com APTMS tinha cerca de  $0.132 \text{ mm}^2$ , ou seja, a área aproximada de uma célula. Este composto permitiu manter a célula presa ao suporte, funcionando concomitantemente como sensor iónico. Esta camada sensível permite que, quando aplicada uma corrente através do micro fio, sejam detetadas acidificações do microambiente, fenómeno intrinsecamente associado

a este tipo de células (Wu *et al*, 2012). A introdução de um agente anticancerígeno capaz de induzir a apoptose devido a alterações mitocondriais, possibilitou averiguar a eficácia do dispositivo, tendo em conta o registo de acidificação do meio em causa relativamente ao meio de controlo.

A opção dos autores foi baseada em trabalhos prévios desenvolvidos por *Valentini* e colaboradores, onde se demonstrou que os grupos amina oferecem uma maior adesão das células, bem como uma taxa de sobrevivência maior quando estas se inserem no substrato (Wu *et al*, 2012).

Outra utilização do APTMS, prende-se com a ligação de proteínas aos substratos. *Gubala* e colaboradores fizeram uso do APTMS de forma a promoverem a ligação de BSA ao interior de tubos de microfluídica. Em trabalhos datados de 2013, utilizaram *coating* com APTMS e complexos de APTMS-BSA em substrato de COP (Zeonor®) com o objetivo de medir o fluxo dependente da proteína IgG e a adsorção de ADN em microcanais (Gubala *et al*, 2013).

Quando se pretende proceder a este tipo de sinalização, é comum utilizar-se, para além do APTMS, o MPTMS, ou seja, o 3-mercaptopropiltrimetoxi-silano.

Este composto apresenta similitude com o APTMS, pois contém um mesmo núcleo de sílica, e possui um grupo tiol em vez do grupo amina. Em operações de *coating*, este composto privilegia a adsorção de moléculas com especial afinidade para se ligarem ao átomo de enxofre, como por exemplo o ouro. Na sequência deste trabalho com nanopartículas de ouro, foi por isso logicamente utilizado um substrato com *coating* em MPTMS. O facto de este conseguir estabelecer ligações com átomos e moléculas específicas dota-o de uma grande variedade de aplicações.

Wu e colaboradores utilizaram o MPTMS como um modificador da superfície de nano-sílica para o tratamento com luz UV. Os grupos tiol à superfície provocaram uma diminuição dos níveis de oxigénio durante o tratamento.

Blassini e colaboradores procuram desenvolver outras aplicabilidades do MPTMS, focando-se nos elétrodos para biossensores. Os autores funcionalizaram elétrodos de iodo e ouro para dispositivos de reconhecimento, tendo conseguido, por exemplo, tornar o seu potencial mais negativo, o que referem ser mais vantajoso no reconhecimento de moléculas. Referem ainda como relevante, o potencial que este composto evidencia de criar nanoestruturas à superfície dos mesmos elétrodos (Blasini *et al*, 2003)

A ligação deste composto a outras moléculas é de uma importância fulcral e leva Cabrera a afirmar que, através de SAMS de MTPMS se conseguirá promover o estudo da eletroquímica ao nível de uma só molécula (Cabrera *et al*, 1996). Assim, consegue-se conciliar a especificidade de enzimas à conveniência das técnicas eletroanalíticas. Ilustrando, os autores Jia *et al* focaram o seu trabalho em soluções sol-gel funcionalizadas com MPTMs, capazes de adsorver nanopartículas de ouro com *horseradish peroxidase* (HRP) à superfície, o que culminou na construção de elétrodos amperométricos baseados em enzimas (não só a HRP mas também a glucose oxidase e a urease) (Jia *et al*, 2002).

As Ciências Biomédicas têm também vindo desenvolver estudos valiosos no sentido de criar formas de se proceder à libertação controlada de fármacos, onde o MPTMS tem um papel de extrema importância.

Desta forma, Irmukhametova *et al*/recorreram a este composto na funcionalização, mais uma vez, de nanopartículas de sílica, da qual resultaram nanopartículas funcionalizadas, com tamanho inferior a 100nm, estabilidade coloidal em água e capazes de reterem volumosas quantidades de excisões de córnea bovina. Esta última propriedade prende-se com a capacidade de estas se adsorverem e concentrarem em superfícies mucosas, o que, na ótica dos autores, se deve à capacidade de ligação dos grupos tiol aos domínios ricos em cisteína, característicos das mucinas.

Este particular estudo teve repercussões positivas na farmacologia, com especial enfoque para os fármacos libertados ao nível das mucosas, ou que necessitam de uma maior concentração das mesmas junto do tecido-alvo, de forma a serem capazes de atuar eficazmente (Irmukhametova *et al*, 2011).

As moléculas utilizadas na funcionalização são dotadas de uma enorme versatilidade, possuem afinidade com diversas moléculas e encontram-se exaustivamente descritos na literatura, o que os torna ótimos para a realização deste trabalho. A sua capacidade de criar pontos de ancoragem para as nanopartículas de ouro que funcionarão também como pontos de ancoragem para o *electroless plating*, é essencial para o êxito do trabalho. Uma alternativa que poderia ser interessante seria utilizar compostos que pudessem ligar-se ao ouro através de grupos CN. No entanto, uma vez que a sua afinidade seria menor, os compostos utilizados foram os mais indicados.

# 7. MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 1. Materiais

Neste trabalho foram utilizados o ácido cítrico monohidratado  $\geq 99.0\%$  (Sigma-Aldrich), o hidróxido de sódio, 50% (Sigma-Aldrich), o cloreto de ouro 30wt. % em HCl (Sigma-Aldrich), o borohidreto de sódio  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich), peróxido de hidrogénio 35%wt. (Sigma-Aldrich), APTMS (Sigma-Aldrich), MPTMS (Sigma-Aldrich), ácido trifluoracético 99% (Sigma-Aldrich).

Os solventes utilizados foram água desionizada e metanol  $\geq 99.8\%$  (GC) (Sigma-Aldrich).

## 2. Produção de nanopartículas de ouro

Na produção das nanopartículas foram utilizados as soluções de cloreto de ouro 19%, borohidreto de potássio 39% e de citrato trissódico. Esta última foi preparada a partir de duas soluções: uma de ácido cítrico (0,20 g/mL) e outra de hidróxido de sódio (352,27  $\mu\text{L}$ ). Era acrescentada água desionizada até perfazer 5mL.

Depois de preparadas estas soluções o procedimento de preparação das nanopartículas foi feito num Erlenmayer com um agitador magnético. Foi adicionado 100mL de água desionizada. Adicionou-se 1mL de cloreto de ouro, seguido da adição de 200 $\mu\text{L}$  de citrato trissódico. A mistura repousou durante 1 minuto e foi acrescentado 1mL de borohidreto de sódio. Esta repousou por 5 minutos antes de ser transferida para um frasco onde foi armazenada.

A solução foi armazenada num frigorífico, a cerca de 4 °C e protegida da exposição à luz com folha de alumínio para evitar a sua deterioração.

## 3. Limpeza dos substratos

A limpeza dos substratos é um fator crítico para que os filmes de ouro sejam uniformes e que tenham uma ligação forte ao substrato. A existência de contaminações, sendo as mais comuns de origem orgânica, podem, levar, por exemplo a uma precipitação tanto das nanopartículas de ouro como a formação de agregados de nanopartículas.

O principal método utilizado durante este trabalho foi a limpeza por plasma de oxigénio. Foi utilizado o Plasma System Zepto da Diener. O tempo de exposição do substrato ao plasma foi de 5 minutos.

Devido ao ambiente altamente oxidante (no caso do plasma de oxigénio, já foi referido anteriormente) este processo não só tem como objetivo a limpeza, mas a própria ativação da superfície que vai ser funcionalizada.

#### **4. Funcionalização dos substratos**

A funcionalização dos substratos foi feita com base em dois compostos já descritos anteriormente: o 3-Amino-propiltriethoxisilano (APTMS) e o 3-mercaptopropiltrimethoxisilano (MPTMS). Estes têm como objetivo, a alteração da superfície dos substratos de modo a que tenha grupos funcionais  $\text{NH}_2$  no caso do APTMS e  $\text{SH}$  no caso do MPTMS que irão mediar a acoplagem das nanopartículas ao mesmo. Para isso foram imersas *over night* em soluções de APTMS ou MPTMS a 10% em metanol. De seguida, foram lavadas em 2 ciclos de água e, depois, metanol. No fim foram secas com azoto gasoso, sendo, de imediato, utilizadas na fase seguinte

#### **5. Acoplamento das nanopartículas**

O acoplamento de nanopartículas foi conseguido utilizando a solução de nanopartículas referido num ponto anterior. Os substratos, então funcionalizados foram imersos na solução de nanopartículas durante vários períodos de 6 horas ou 16 horas. No fim deste banho, os substratos foram lavados com água desionizada e utilizada de seguida na deposição não eletrolítica.

#### **6. Deposição não eletrolítica**

A solução na qual ocorreu a deposição tinha um volume em água de 100mL, à qual foi adicionado 29,75  $\mu\text{L}$  de cloreto de ouro 30wt. % em HCl. Depois o substrato foi mergulhado na solução. A reação tinha início quando foi adicionado 4,285mL de peróxido de hidrogénio 35wt. Toda a reação ocorreu sob agitação com ajuda de um agitador magnético.

## **7. Métodos de Caracterização**

Para averiguar a qualidade dos filmes foram utilizados dois equipamentos. O mais utilizado foi o espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu UV-3101PC. Todas as leituras foram recolhidas no intervalo de comprimentos de onda entre os 200 e os 800 nm, com um intervalo de 1 nm, abertura de 0,8 nm e a velocidade de varrimento do equipamento é média.

Foi ainda utilizado o microscópio de força atómica MultiMode SPM NanoScope IIIa da Digital Instruments operado em modo de contacto e controlado pelo software Nanoscope 5.30r2 sendo que algumas das imagens foram ainda tratadas através do programa Gwyddion.

## 8. RESULTADOS

Após a produção das nanopartículas é de primordial importância verificar se estas exibiam a banda de absorção correspondente ao plasmão de superfície e se se mantinham estáveis ao longo do tempo.

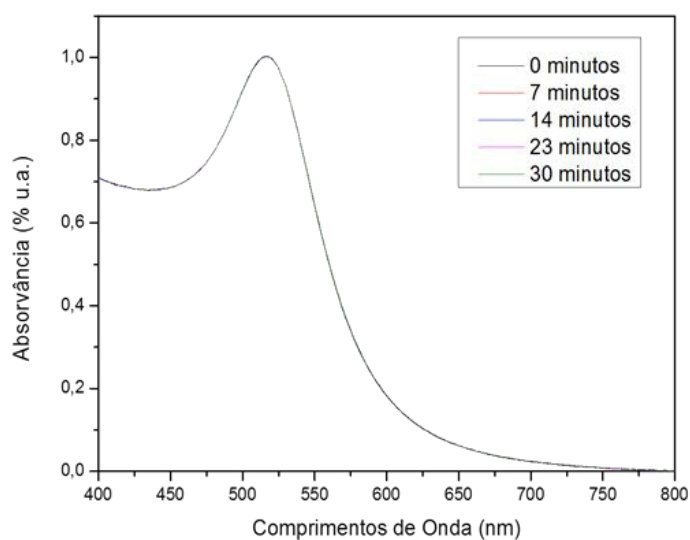
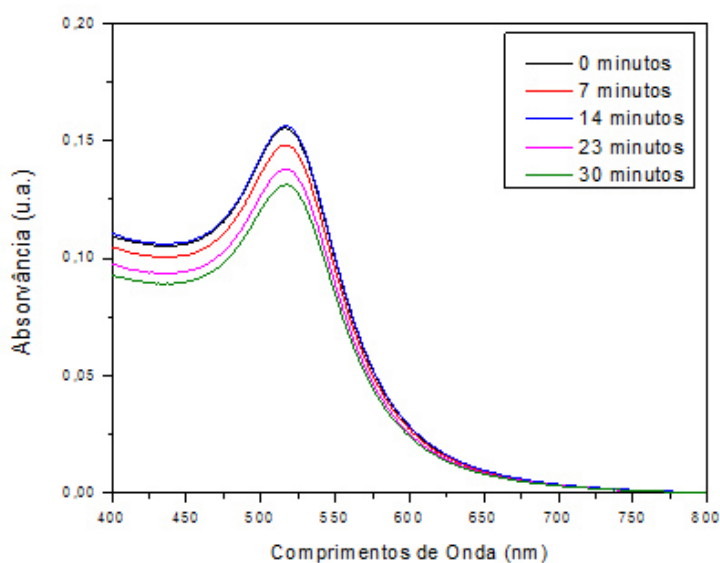


Gráfico 1 – Absorvância ( em cima) e a absorvância normalizada (em baixo) das nanopartículas em suspensão em vários tempos ao longo de 30 minutos.



O gráfico 1 mostra os valores de absorvância normalizados das nanopartículas de ouro ao longo do tempo. É possível verificar um pico bem definido a cerca de 520nm e que é indicador da presença do plasmão. Segundo a literatura, o pico de absorvância do plasmão a este valor indica que as nanopartículas têm um diâmetro entre os 5 e os 20 nm. (Daniel e Astruc, 2004)

Verifica-se algumas oscilações no que diz respeito aos valores medidos em diferentes tempos ao longo dos 30 minutos. No entanto, como podemos ver na sua absorvância normalizada, os espectros não alteram a sua forma. Isto indica-nos que as nanopartículas têm um comportamento dinâmico com absorção do plasmão a oscilar com tendência a descer.

A solução de nanopartículas foi armazenada a cerca de 4 °C e coberta por uma folha de alumínio.

De seguida, verificou-se se era possível funcionalizar os substratos com as nanopartículas de ouro. Nesta fase, o substrato, sem qualquer tratamento, foi deixado em contato com as nanopartículas durante 6 horas. Após o banho, o substrato apresentava uma cor ligeiramente rosada sugerindo que tinha, de facto, ocorrido a adsorção das nanopartículas ao mesmo. No gráfico 2 mostra-se a absorvância desse substrato.

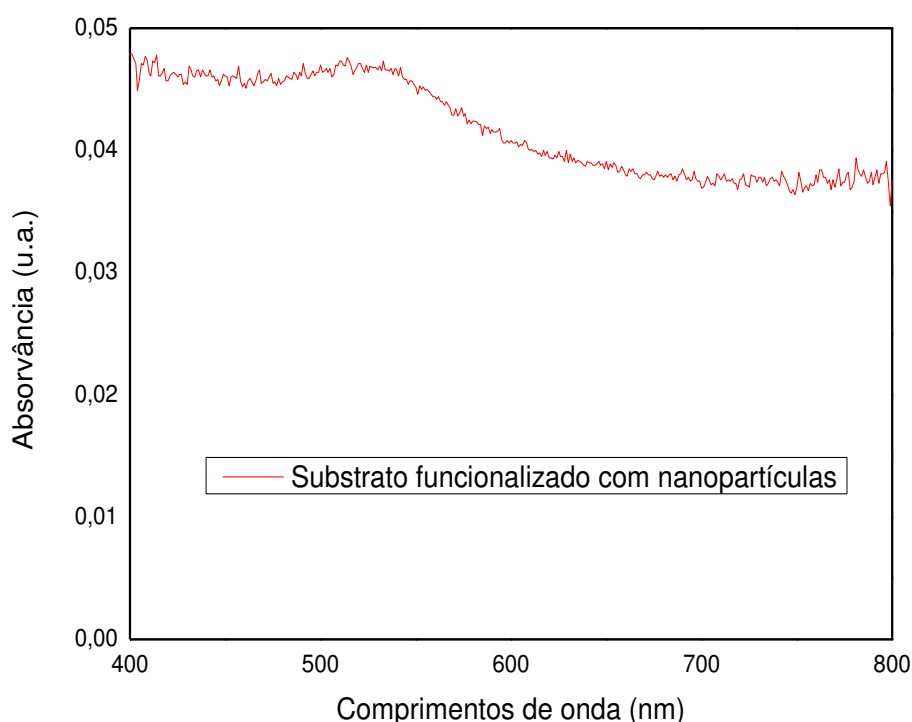


Gráfico 2 - Absorvância de substrato de vidro imerso na solução de nanopartículas *over-night*.

Apesar dos baixos valores de absorvância obtidos, é perceptível um ténue pico na zona dos 520nm, coincidente com o detetado no gráfico da absorvância das nanopartículas. Deste modo, há a certeza de que ocorreu adsorção das nanopartículas ao substrato.

Este substrato foi, posteriormente, utilizado para a deposição não eletrolítica, com um tempo de reação de 5 minutos. É de salientar que, na execução desta etapa, o método utilizada para a agitação não foi o mais adequado. Recorreu-se a um agitador magnético e o substrato assentou, na horizontal, em dois suportes de plástico que condicionou a formação do filme numa das faces.

No fim da reação obteve-se em ambas as faces do filme uma cor azulada e pouco uniforme, pontuada com diversas manchas. Assim, foi medida a absorvância em várias zonas do filme a fim de se confirmar a ocorrência da deposição do ouro e se a pouca homogeneidade do filme era passível de ser traduzida em valores numéricos de luz absorvida. Os valores de absorvância deste filme não foram apresentados uma vez que o filme não estava minimamente homogêneo

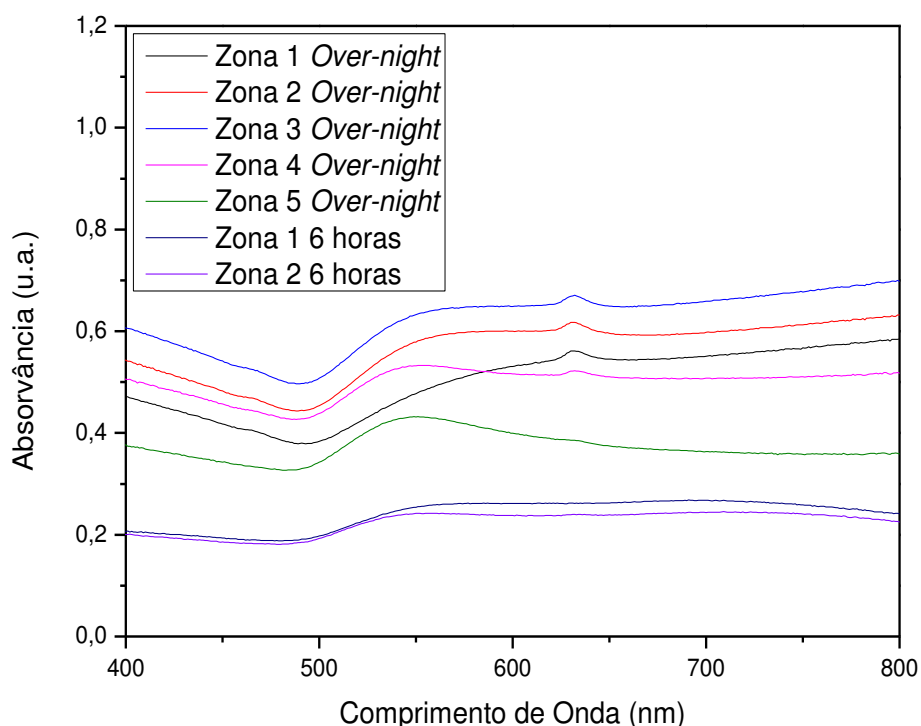


Gráfico 3 - Absorvância dos filmes de ouro, com tempo de reação de 5 minutos nas várias zonas dos filmes. No primeiro o substrato esteve em banho do APTMS *over-night* e no segundo caso apenas durante 6 horas.

O passo seguinte passou pela preparação de dois filmes sem ativação por plasma de oxigénio, com funcionalização em APTMS com tempos de banho diferentes. O banho de nanopartículas foi de 6 horas e o tempo de reação de deposição foi de 5 minutos. No gráfico 3 vemos a absorvância desse filme. Nele denota-se que o perfil de absorvância é discordante entre as diferentes áreas do filme. As áreas avaliadas dizem respeito a pontos equidistantes ao longo do substrato e por ordem de numeração. Como tal, a zona 1 corresponde a uma extremidade do substrato e a zona 5 a outra.

Não se verifica uma correlação por zonas, isto é, não é apreciável um gradiente de absorção da zona 1 até à zona 5. Ao invés, pode-se dizer que se verifica uma aleatoriedade da mesma. Apesar disso, deteta-se um ligeiro pico na zona anteriormente destacada, ou seja, aos 520nm e que corresponde ao plasmão. Conclui-se que o tempo de banho de funcionalização dever ser *over-night*.

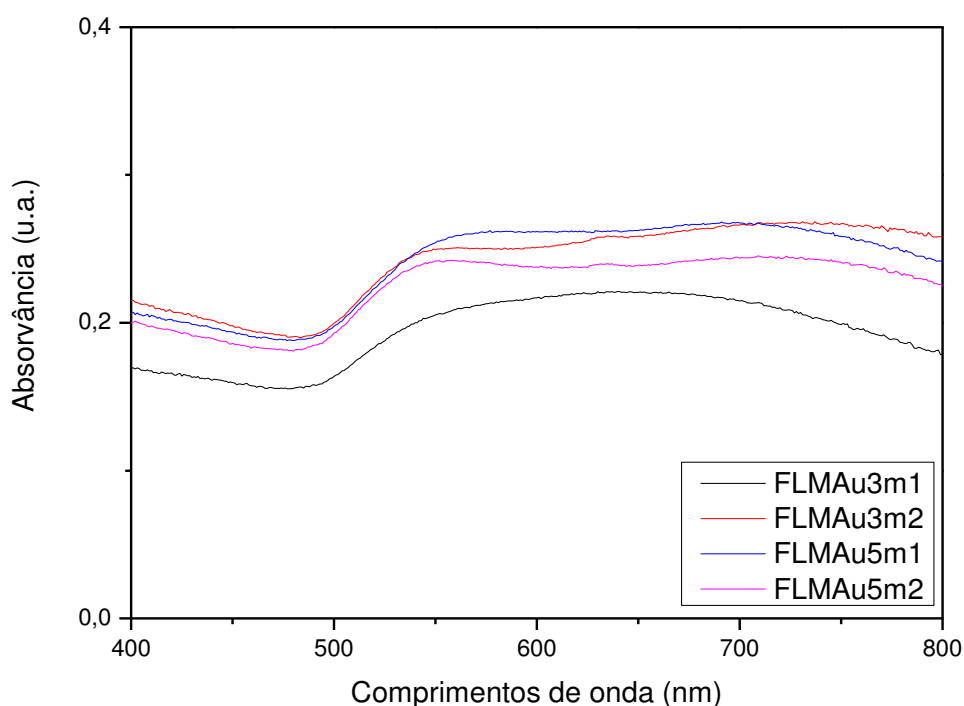


Gráfico 4 - Absorvância dos filmes de ouro, com tempo de reação de 3 e 5 minutos e sem pré-tratamento do substrato e com banho de nanopartículas de 6 horas

Assim sendo, o passo consistiu em verificar as diferenças entre outros parâmetros, nomeadamente o tempo de reação da deposição. O gráfico 4 diz respeito às medições da absorvância das zonas 1 e 2 (a medição de 5 zonas, como efetuada anteriormente aparentou-se despropositada) com um tempo de incubação de 6 horas que segundo Hu *et al* é suficiente e com tempos de reação de deposição de 3 e 5 minutos. Este substrato não teve o tratamento or plasma de oxigénio sendo apenas sujeito ao banho em APTMS *over-night*.

Mais uma vez, os filmes obtidos não se exibiam homogêneos e continuavam a apresentar uma cor azulada. Na zona 2, que apresenta uma maior quantidade de ouro depositada, a reação de deposição com a duração de 3 minutos parece ter sido mais efetiva e de intensidade um pouco maior. O pico a cerca de 520 nm, no caso da zona 1 com tempo de reação de 3 minutos, é sobreposto por uma banda larga a cerca de 650 nm. Esta banda é visível também nos outros espectros. De acordo com Pérez-Juste *et al*, esta banda diz respeito ao plasmão longitudinal e vai se deslocando para comprimentos de onda maiores à medida que o ouro vai perdendo a sua forma mais esférica, característica das nano-ilhas de ouro que serviram de ponto de ancoragem. Assim sendo, com o aumento do tempo de deposição, e, conseqüentemente, do alogamento desses pontos de ancoragem até, idealmente, formarem um filme contínuo, essa banda vai se deslocando. (Pérez-Juste *et al*, 2005) De acordo com o trabalho de Lansaker, os espectros dos filmes de ouro têm um aumento do valor máximo do pico a 520 nm assim como um alargamento para comprimentos de onda maiores. Apesar de subtil, este efeito é visível nos filmes obtidos (Lansaker, 2012)

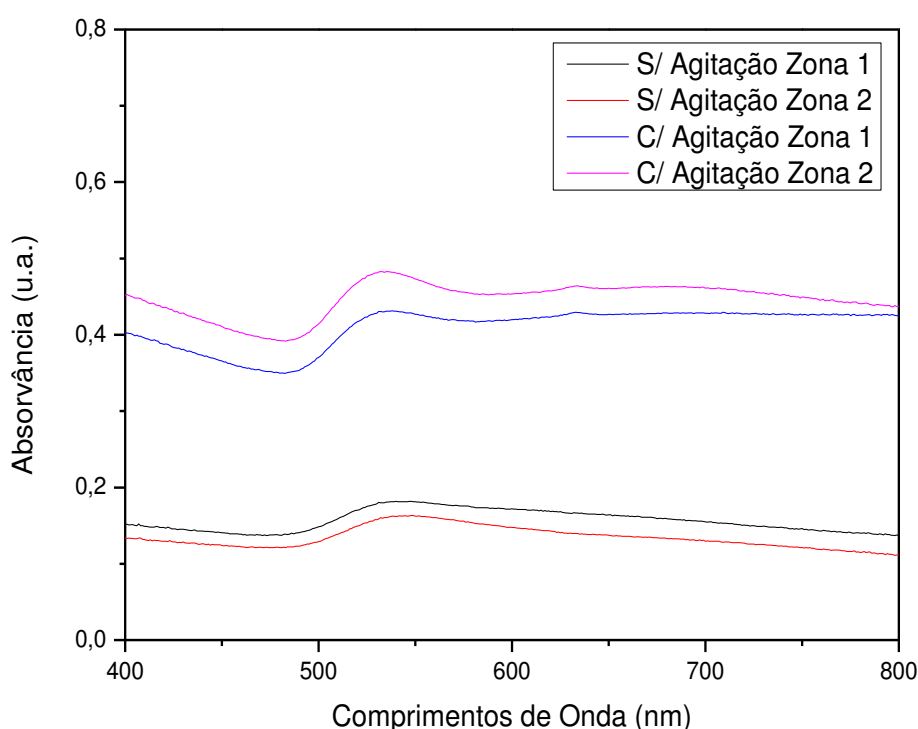


Gráfico 5 – Absorvância de filmes de ouro, com tratamento com APTMS *over night* e reação de deposição com e sem agitação.

Uma vez que uma das dificuldades encontradas na execução deste trabalho se prendia com a arquitetura da reação, especificamente no modo de manter a agitação, achou-se pertinente avaliar a importância que a agitação tinha na qualidade/características do filme de ouro. Para tal, foram depositados dois filmes de ouro: um com agitação e outro sem agitação. Os parâmetros utilizados foram as 6 horas de incubação e o tempo de 5 minutos de reação de deposição. O fato de anteriormente se terem obtido filmes com aspeto azulado e pouco uniformes, optou-se por trata-los com APTMS em metanol *over-night*, almejando assim maior facilidade na adsorção das nanopartículas através da ação dos grupos amina que este composto possui. Após o banho, o filme foi lavado com metanol e água.

O gráfico 5 pretende mostrar a influência que a agitação tem nos filmes. Os filmes foram, por isso produzidos tendo como única diferença a agitação ou não durante a deposição não eletrolítica. De resto, os substratos foram ativados por plasma de oxigénio e tratados com APTMS *over-night*. Foram depois sujeitos a uma banho de nanopartículas de 6 horas. Verifica-se que a absorvância em ambas as zonas do substrato que teve agitação é bastante mais elevada e que o próprio pico do plasmão é mais pronunciado. Parece, por isso, evidente que não só a agitação é crucial para a formação do plasmão como esta pode ser a resposta para a falta de homogeneidade que os filmes demonstravam.

Durante o banho de nanopartículas, na preparação destes filmes, ocorreu a formação de

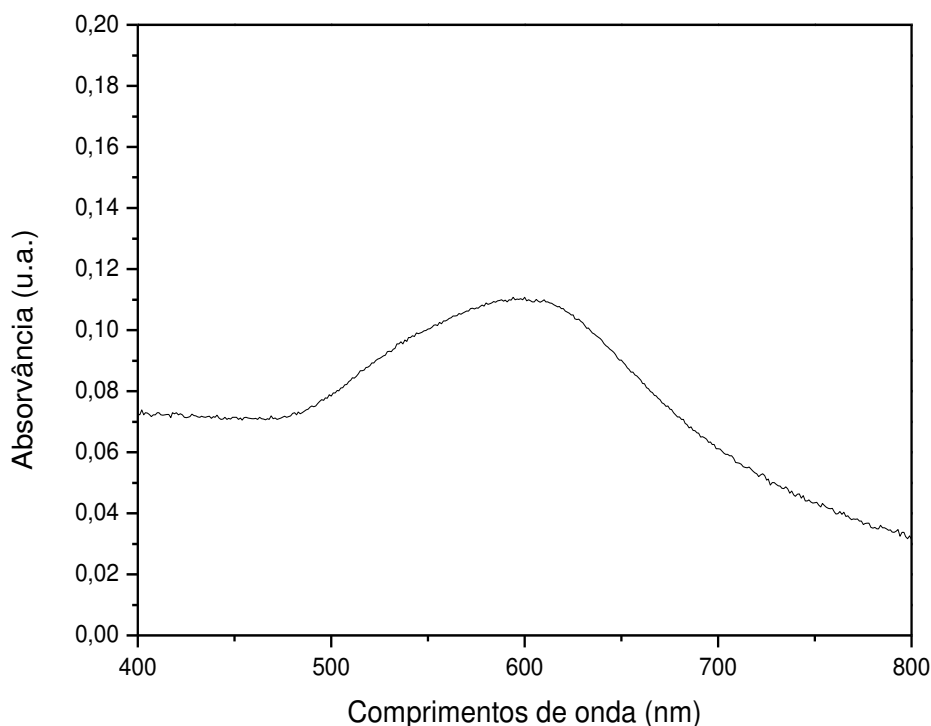


Gráfico 6 – Absorvância do precipitado do banho de nanopartículas ressuspensão e sujeito a ultrassons

um precipitado. A razão a que se deve a sua ocorrência pode ter sido a agregação causada por moléculas de APTMS que não foram bem lavadas. Deste modo, e para evitar o fenómeno anterior, o processo de lavagem após o tratamento com APTMS foi ajustado, passando a lavar-se 3 vezes com metanol alternado com 3 vezes água. Com a adição desta etapa, pareceu conseguir-se resolver o problema. O precipitado foi ressuspenso em água, sujeito a ultrassons e foi medida a sua absorvância, descrita no gráfico 6. Este deverá conter partículas de ouro bem maiores como resultado da junção de várias nanopartículas. Pelo gráfico correspondente conclui-se que a absorvância é considerável mas o pico, que nas leituras anteriores era bem definido a 520nm, desloca-se, apesar de não estar tão bem definido, para os 600nm. O gráfico sugere que há agregados de partículas. De facto, as bandas alargadas no intervalo de comprimentos de onda entre os 600 nm e os 700 nm, obtidas nos espectros de absorção dos filmes de ouro, podem querer dizer que estes agregados existam nesses filmes também aí estejam presentes. Assim, a estrutura contínua pretendida não tem sido obtida.

Um dos parâmetros ainda não testado era o tempo de banho de nanopartículas e portanto, perceber de que modo os filmes poderiam ser melhorados de acordo com as características do mesmo. De modo a testar, foram preparados dois filmes de ouro com diferentes tempos de banho de nanopartículas: um de 6 horas e outro de 16 horas. Numa tentativa de conseguir filmes mais homogéneos, o substrato foi sujeito a um tratamento por plasma de oxigénio numa fase anterior à funcionalização com APTMS. Por um lado pretendia-se que houvesse a eliminação de possíveis contaminações e ao mesmo tempo, procurava-se facilitar a reação do substrato com o APTMS (devido aos radicais que este tratamento consegue produzir), melhorando a sua funcionalização.

Alterou-se ainda a arquitetura dos banhos de nanopartículas e de reação de deposição do ouro. O substrato passou a ser introduzido no banho na vertical, num copo graduado e segurado por uma pequena garra. Deste modo, uma pequena porção do substrato fica sem o filme, mas no resto do substrato obtém-se filme em ambos os lados. A agitação na reação de deposição, continua a ser feita com um agitador magnético mas colocado no fundo do referido copo graduado.

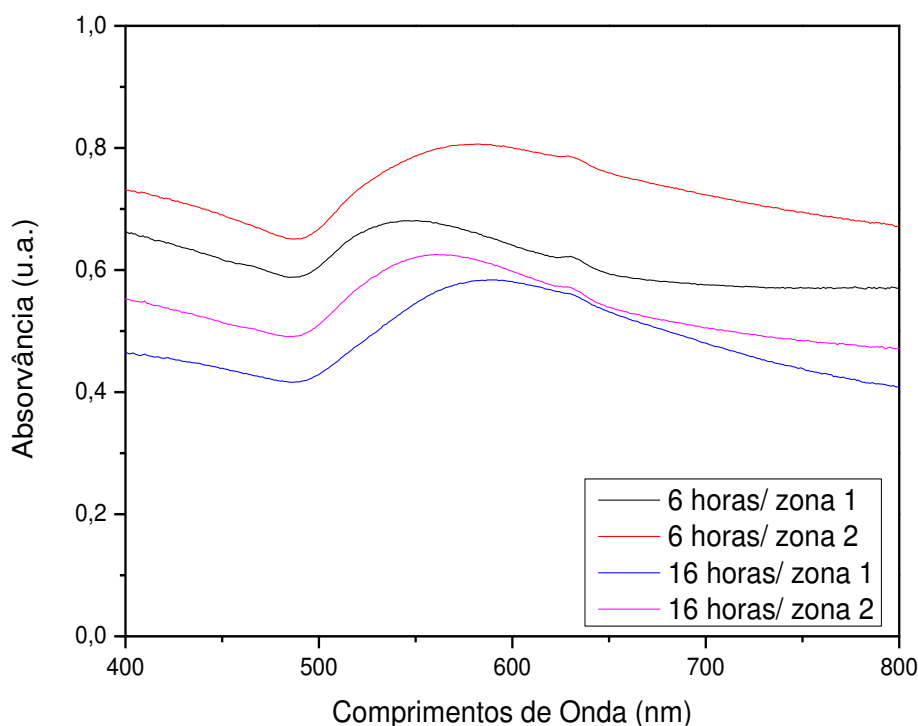
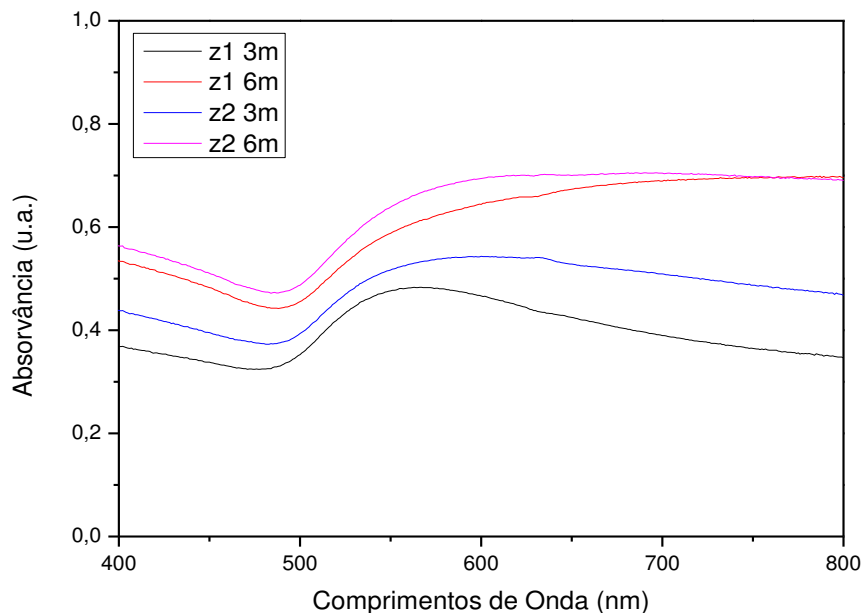


Gráfico 7 – Absorvância de 2 filmes de ouro com tratamento de APTMS em metanol *overnight* e banho de nanopartículas de 6 e 16 horas. Tempo de reação de deposição de 5 minutos.

O gráfico 7 mostra que, apesar de uma exposição mais prolongada a nanopartículas de ouro, os filmes produzidos não têm uma maior absorvância. Maior tempo de contacto do o substrato com as nanopartículas corresponderá a uma maior utilização dos grupos amina na superfície do substrato. Assim, os resultados do gráfico 7 sugerem que grupos amina livres promovem o processo de deposição não electrolítica. Assim sendo, o aumento da qualidade dos filmes não deve passar pelo aumento de contacto com as nanopartículas.

Devido a esta nova metodologia dos banhos, as diferenças entre a zona 1 e 2 adquirem um novo significado. Observando o gráfico 7, com especial enfoque para a zona 1, podemos verificar uma deslocação do pico de 520nm para zona dos 600nm no caso das 6 horas. Esta deslocação parece não ocorrer nos substratos de 16 horas. Esta região está mais longe do agitador, o que poderá significar que a própria agitação exercerá a sua influência na qualidade do filme e não só na quantidade de ouro depositado como havia sido exposto anteriormente. Uma maneira de atenuar a sua influência pode ser o tempo do banho de nanopartículas.

Deste modo, tentou-se perceber se estas alterações variavam conforme diferentes tempos de reação de deposição, isto porque, neste caso, as condições diferentes da zona 1 e da zona 2 poderiam ser mais facilmente visíveis. O tempo de reação foi alterado de modo a obter uma diferença considerável entre ambos os tempos.



**Gráfico 8 - Absorvância de filmes de ouro preparados com tratamento por plasma de oxigênio, funcionalização de APTMS *over-night* e banho de nanopartículas de 6 horas. Temos de reação de deposição 3 e 6 minutos.**

Os resultados obtidos e ilustrados no gráfico 8 não evidenciam diferenças significativas em relação aos dados obtidos anteriormente e reforçam a ideia que 5/6 minutos é o tempo ideal para que a deposição aconteça.

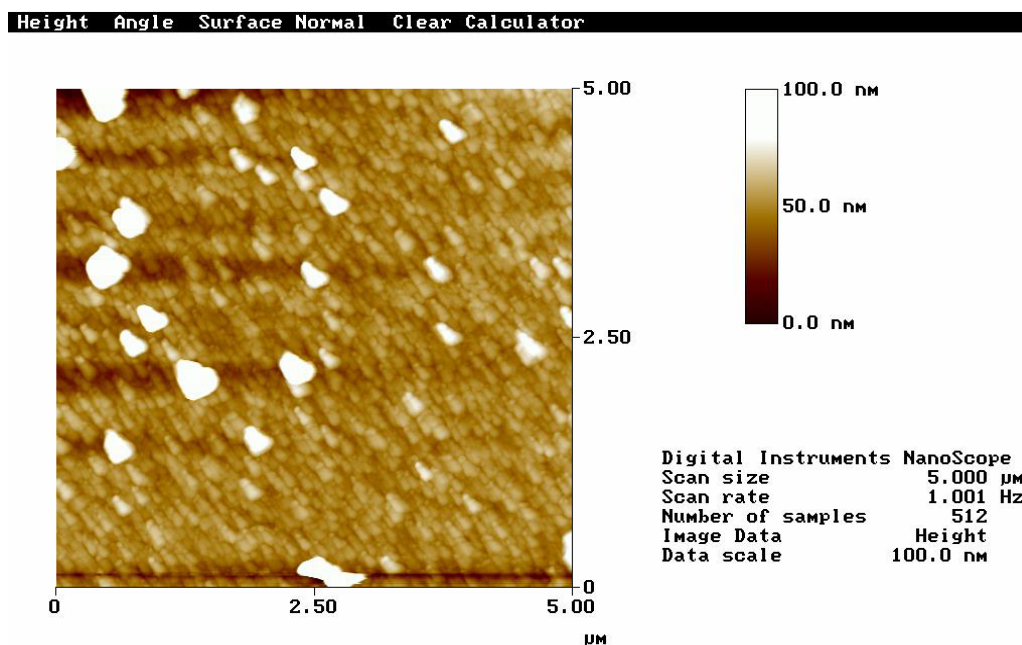
Podemos verificar que para tempos de 6 minutos, a banda larga situada a cerca de 600 nm não está presente. Mais uma vez reforça a ideia que o alongamento dos pontos de acoragem até formarem o filme contínuo contribui para o seu deslocamento para zonas do vermelho. Assim sendo, estes terão melhor qualidade pois deduz-se que não há a presença das nano-ilhas na estrutura geral do filme. Podemos ainda concluir que, independentemente da espessura do filme, estes apresentam um mínimo de absorção a 500 nm.

Foram realizadas outras medições, utilizando-se por sua vez o microscópio de força atômica (MFA) em modo de contato, no sentido de se avaliar a rugosidade dos filmes e, se possível, a sua espessura.

A adequação desses parâmetros permite a utilização dos filmes como biossensores e possibilita a ocorrência do plasmão de superfície.



De forma a efetuar as medições necessárias foram utilizados os filmes de ouro previamente preparados com diferenças registadas no tempo de exposição às nanopartículas de ouro (6 e 16 horas).

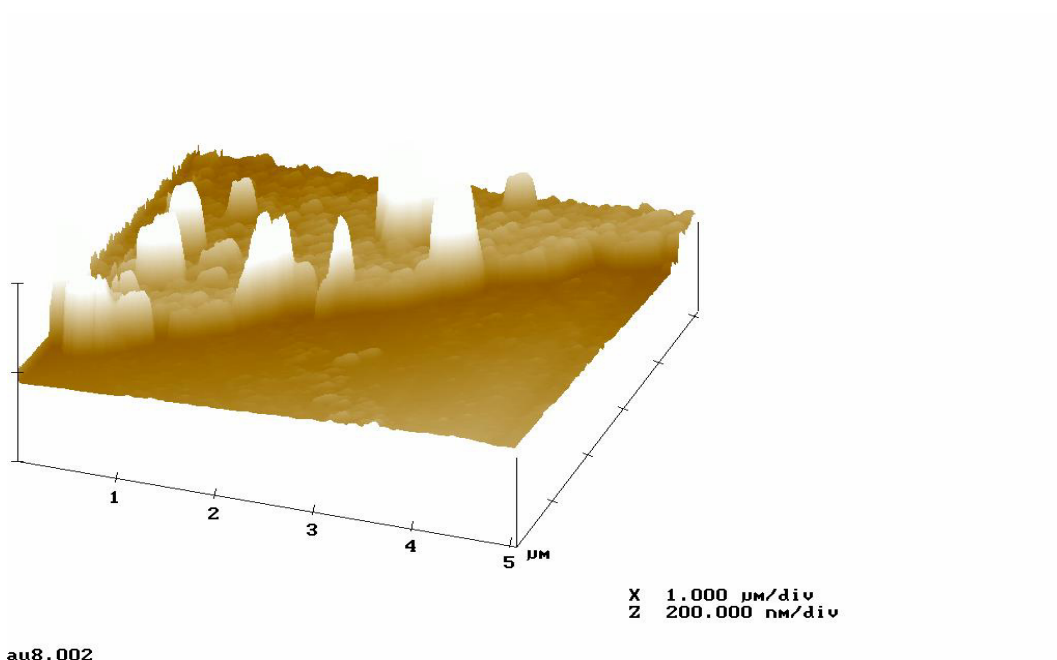


au8.000

Height

Imagem 3 - Imagem de MFA em modo de contacto *flattered* da superfície do filme de ouro com banho de nanopartículas de 6 horas.

Na imagem 3 verifica-se que o filme está relativamente homogéneo. No entanto, são visíveis alguns pontos de maior acumulação do ouro. Estas acumulações de ouro em determinadas partes do filme podem justificar as bandas nos comprimentos de onda entre os 550 nm e os 600 nm pois introduzem algum grau de localização do plasmão. Numa análise mais estatística da rugosidade, temos que a raiz quadrada da média (RMS) da rugosidade da superfície é de 16,418nm e que a rugosidade média (Ra) é de 8,648nm. Quando estes valores são comparados com os obtidos noutros trabalhos, por exemplo, os de Hu *et al*, percebemos que estes se encontram bastante inflacionados (RMS de 3,74nm e Ra de 2,86nm). Esta discrepância indica-nos que o filme não possui uma elevada qualidade e que tem zonas de elevada acumulação de ouro.



au8.002

Imagem 4 – Imagem de MFA, em modo de contato, a 3D, do filme de ouro com banho de nanopartículas de 6 horas.

Na imagem 4 são notórias as diferenças entre os picos e o resto do filme. O fato de este filme apresentar um risco revelou-se particularmente útil uma vez que assim podemos ter uma melhor percepção da espessura do filme, avaliada em cerca de 53,821nm (imagem 5)

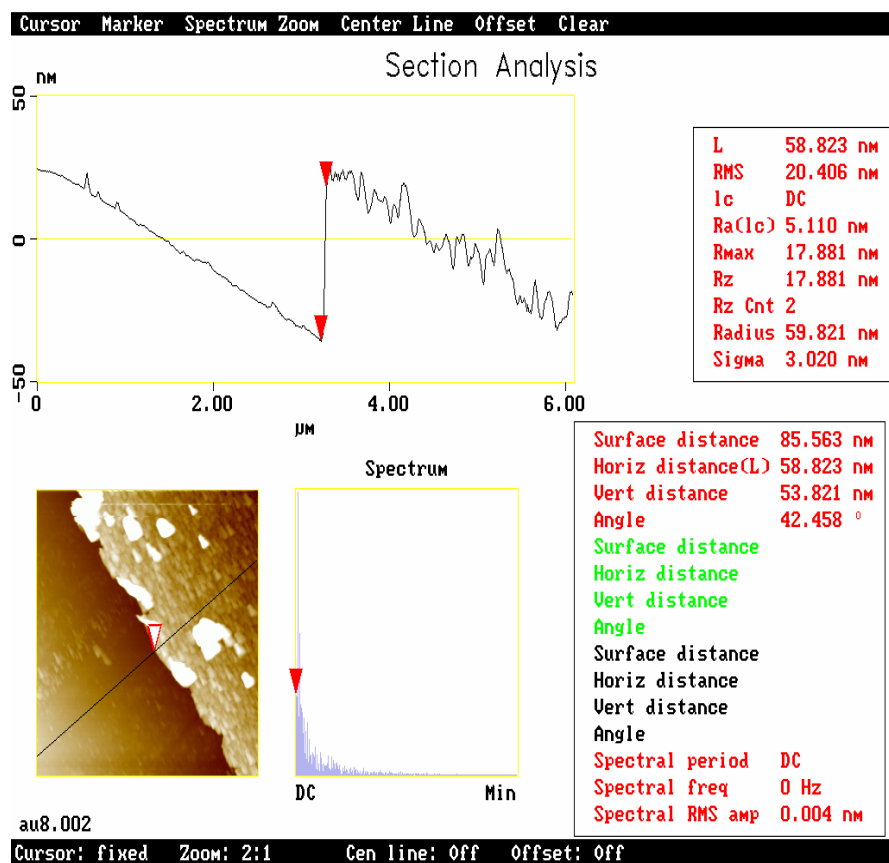
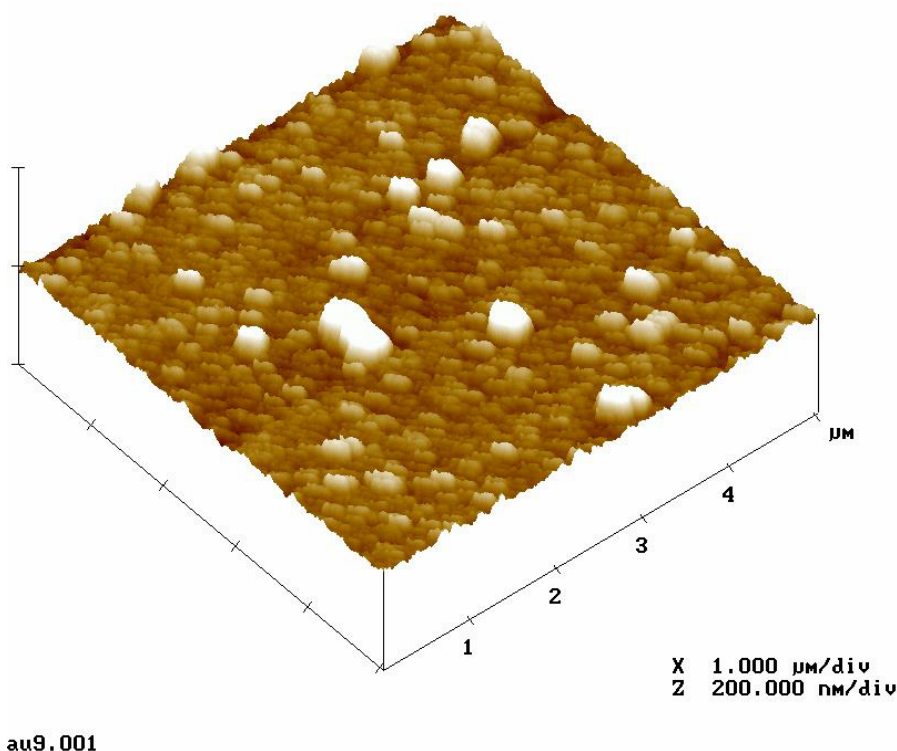


Imagem 5 – Análise de uma secção do filme de ouro em que é medida a sua espessura.

No caso do filme que teve em banho de nanopartículas de 16 horas, imagem 6, este apresenta características muito semelhantes ao caso anteriormente analisado.

Ainda assim, os valores de RMS e Ra medidos neste filme são, respectivamente, 8,909nm e 5,775nm, o que revela uma menor discrepância entre os picos e o restante filme. Quanto ao valor da rugosidade média, este é maior que o obtido por Hu *et al*/mas menor que o filme de 6 horas de nanopartículas. Na imagem 7, é importante salientar a dimensão bastante menor dos picos. Ao contrário do que se verificou no filme com banho de nanopartículas de 6 horas, este não evidencia nenhum risco, o que não permitiu obter uma boa medição da espessura do filme.

Os riscos apresentados no filme estão associados a processos de desgaste mecânico, provocados pelas garras do suporte do espectrofotômetro, aquando das medições da absorvância. Durante este trabalho prático, todos os filmes revelaram a mesma suscetibilidade, o que acaba por constituir uma das principais fragilidades dos filmes, que devem apresentar uma determinada resistência por forma a desempenharem com sucesso a sua função de biossensores.



**Imagem 6:** Imagem de MFA, em modo de contato, a 3D, do filme de ouro com banho de nanopartículas de 16 horas.

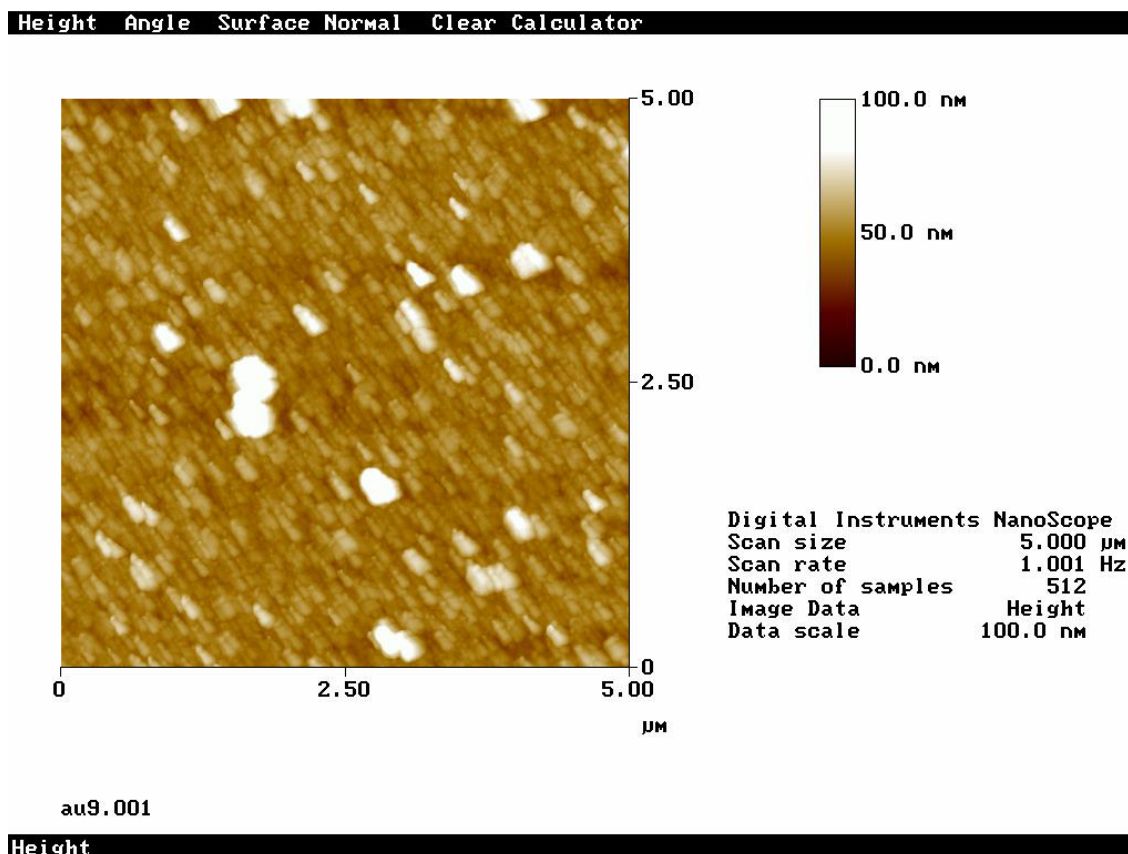


Imagem 7 – Imagem *flattered* do filme de ouro com banho de nanopartículas de 16 horas.

No que diz respeito à rugosidade, a funcionalização de um filme em pontos com espessuras muito diferentes (*i.e.* num pico), poderá comprometer a sua aplicação em biossensores já que o sinal obtido experimentará variações que diminuirão a sua fiabilidade.

De forma a tentar produzir filmes com melhores condições, operou-se uma mudança de estratégia. Esta passou por substituir o APTMS pelo MPTMS. Como referido no capítulo referente a estes compostos, o ouro tem uma maior afinidade para com átomos de enxofre e por isso, teoricamente, seria bastante mais eficaz uma funcionalização do substrato de vidro com MPTMS para a adsorção da nanopartículas de ouro.

Assim sendo, foi feito um protocolo em tudo similar ao anterior mas com a funcionalização *over night* de MPTMS. Este contava com a ativação por plasma de oxigénio, banho *over-night* de MPTMS, posterior banho de 6 horas de nanopartículas e deposição não eletrolíticas. Foram testados na mesma os tempos de reação de deposição de 3 e de 6 minutos.

Os resultados obtidos no gráfico 9 não foram, contudo, os esperados. O aspeto do filme era ainda azulado, o que em comparação com os anteriores e com a desejada cor dourada era sinónimo de uma menor eficácia do método.

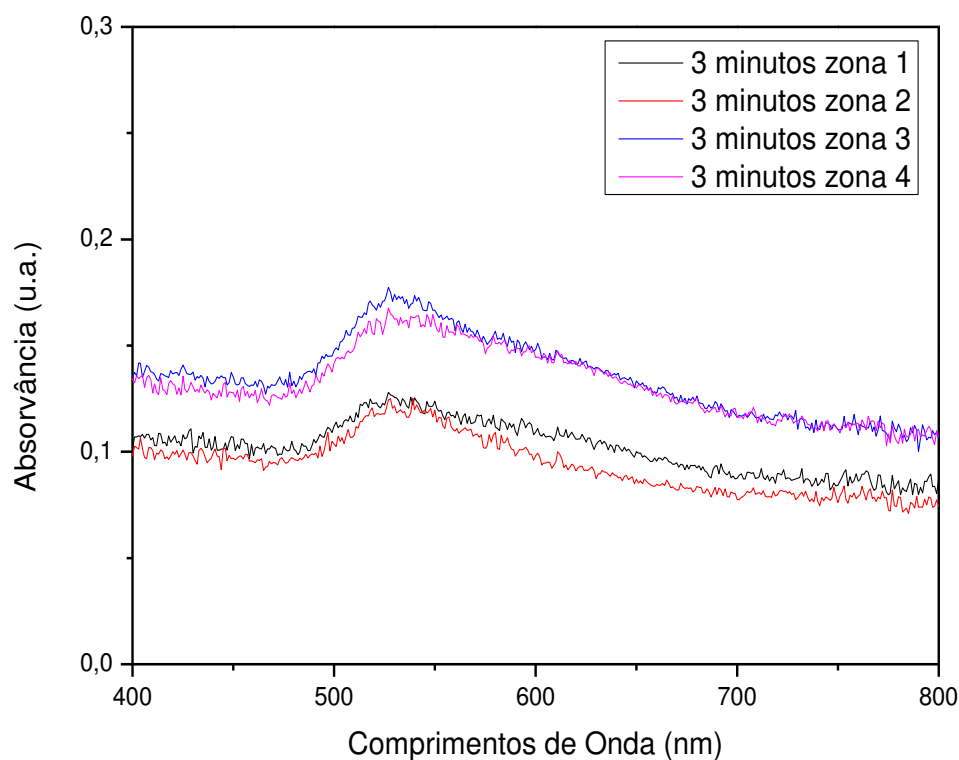


Gráfico 9 – Absorvância dos filmes produzidos com funcionalização dos substratos com MPTMS e com tempos de reação de deposição de 3 e 6 minutos.

Como podemos ver pelo gráfico 9, a intensidade de absorvância revelou-se bastante menor em relação aos substratos de APTMS, o que corrobora a deficiência na adsorção do ouro que já se suspeitava perante a cor do filme obtida.

A possível explicação poderia passar pela ocorrência de ligação dos grupos de enxofre entre si, ficando, assim, indisponíveis para que as nanopartículas se ligassem com sucesso. Essa diminuição dos pontos de ancoragem para a reação de deposição têm como consequência direta a diminuição da quantidade de ouro depositado.

Na tentativa de evitar essas ligações foi levado a cabo um ensaio onde se mantiveram as mesmas condições, acrescentando-se um passo adicional. Logo após a funcionalização, o substrato foi deixado num banho de 2 horas de ácido trifluoracético dissolvido em água. Com a sua utilização pretendia-se conseguir hidrogenar os grupos de enxofre e assim evitar que fossem formadas pontes dissulfito entre eles.

O resultado assim obtido foi bastante mais satisfatório. A cor do filme já era a tradicional cor dourada o que acabou por ter repercussões a nível do espectro de absorção deste filme. O gráfico 10 mostra os valores obtidos de absorvância.

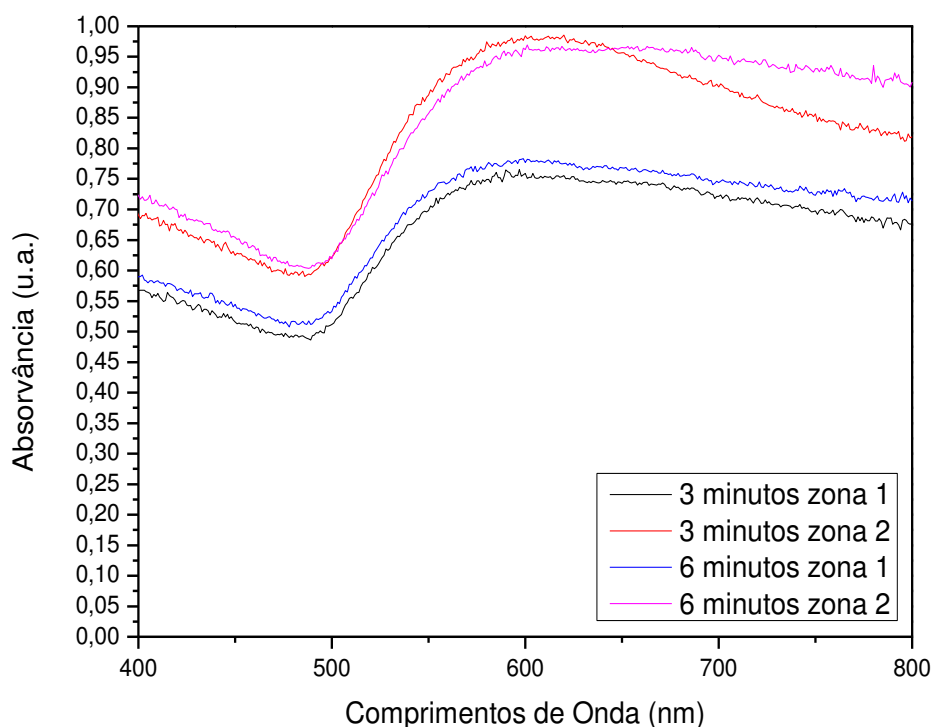


Gráfico 10 – Absorvância dos filmes de ouro produzidos com funcionalização de MPTMS mas com o passo intermédio de banho de 2 horas de ácido trifluoracético.

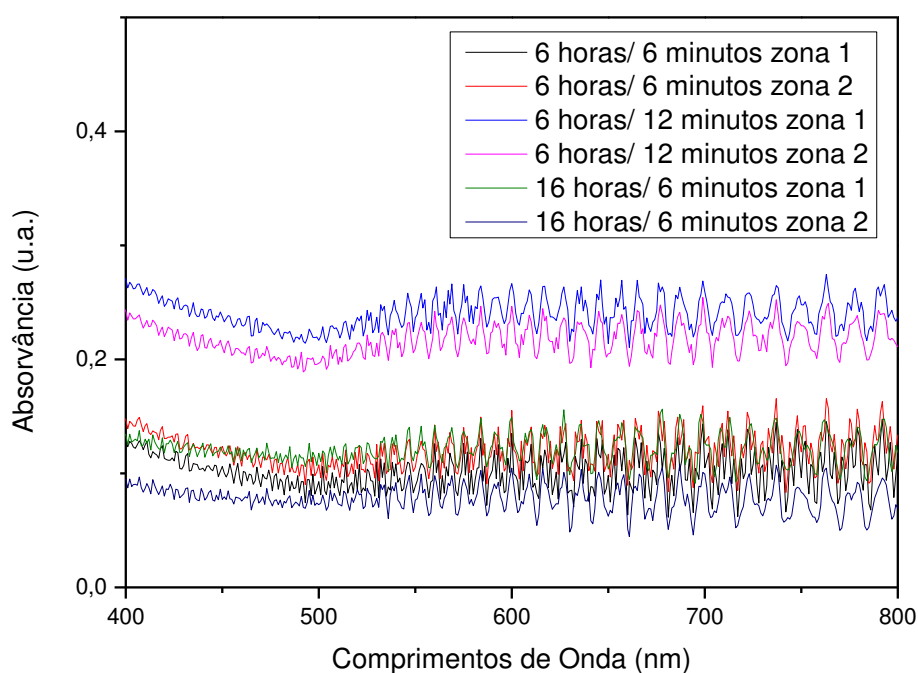
Nesta imagem podemos ver que a adsorção do ouro foi bastante maior do que no ensaio anterior e que este é muito parecido com os valores obtidos com o APTMS. Curiosamente, neste caso, o padrão de deposição do ouro também se alterou, sendo que a zona 2 teve uma quantidade de ouro depositado superior à quantidade de ouro depositado na zona 1.

Contudo, os ensaios com MPTMS continuaram a conotar a fragilidade detetada nos filmes produzidos com a funcionalização com APTMS. Isto porque à medida que iam sendo medidas as absorvâncias dos filmes, estes iam ficando riscados. Concluiu-se, por isso, que a utilização do MPTMS não constituiu, em última análise, uma mais-valia na produção dos filmes.

De seguida, tentou-se avaliar os resultados da substituição do substrato de vidro por um substrato de mica e perceber se esta alteração poderia significar uma maior eficácia na adsorção das nanopartículas de ouro.

Os passos que foram seguidos na preparação dos filmes foram a funcionalização com APTMS (note-se que o passo de limpeza por plasma de oxigénio foi retirado uma vez que não é

prática comum neste tipo de material e poderia levar à deterioração do material e/ou do equipamento), banho de nanopartículas de 6 e 16 horas e reação de deposição de 6 e 12 minutos.



**Gráfico 11 – Absorvância dos filmes produzidos no substrato de mica.**

Os filmes obtidos apresentavam uma cor azulada o que previa uma fraca deposição do ouro. No entanto, após as medições da absorvância dos vários filmes, estes não apresentavam qualquer tipo de risco.

Os valores de absorvância do filme encontram-se apresentados no gráfico 11 e mostram que a adsorção não foi a pretendida.

Os valores de absorvância são muito baixos em relação a todos os ensaios anteriores e, por isso, não parece plausível a sua superior qualidade. Para além disso, o próprio pico do plasmão de superfície é pouco definido e só é inequivocamente notado no ensaio de 6 horas de banho de nanopartículas e de 6 minutos de deposição.

De facto estas condições são as que têm os valores de absorvância um pouco mais elevados mas não ao nível dos ensaios em que foram utilizados o vidro.

Os espectros apresentam ainda muitas oscilações para todos os comprimentos de onda mas que se acentuam, para comprimentos acima dos 500 nm. Estas podem ficar a dever-se a interferências da luz com a mica, devido à pequena espessura que esta apresenta.



## 9. CONCLUSÃO

---

A importância da nanotecnologia tem conhecido um grande aumento ao longo dos últimos anos. Em grande parte, esta aposta prende-se com a descoberta de novas propriedades com a possibilidade de haver de novas aplicações para as propriedades já bem conhecidas. Em particular, o plasmão de superfície é uma propriedade que tem merecido relevante atenção bem como os filmes de ouro, que têm uma aplicação privilegiada em biossensores.

A produção de filmes de ouro tendo em vista a sua utilização em biossensores é um processo que deve respeitar e aproveitar-se das propriedades específicas do mesmo. É importante que os filmes obtidos possuam algumas características fulcrais como uma elevada homogeneidade, como espessura adequada e quantidade de ouro aceitável. Desses parâmetros depende a formação ou não do plasmão de superfície e, conseqüentemente, a capacidade que o filme pode ter para ser aplicado. Por sua vez, estes encontram-se dependentes das condições inerentes à sua preparação.

Na sequência desta estreita relação de dependência, a deposição não eletrolítica revela-se como uma metodologia que consegue simplificar o processo de preparação e que implica uma redução significativa de custos.

O desenvolvimento de um método de deposição não eletrolítica tem bastante potencial para que possa ser aplicado em biossensores uma vez que a produção em série dos filmes poderá ter vantagem em relação, por exemplo, à deposição eletrolítica.

Neste sentido, e de acordo com os resultados obtidos, um dos aspectos a salientar é a limpeza dos substratos. Como tal, o plasma de oxigénio é uma técnica extremamente interessante. Por um lado, a limpeza do substrato tornou o filme bastante mais homogêneo, mas, por outro, também foi importante no aumento da quantidade de ouro depositado. É de destacar o contributo para a funcionalização inicial (ou sensibilização para a funcionalização com o APTMS) de radicais formados à superfície do substrato. Como alternativa a esta técnica existe a utilização de *solução piranha*, que conta com a desvantagem de ser mais perigoso e por isso muito menos cómoda.

Outro passo extremamente importante é a funcionalização. De acordo com o presente trabalho prático, é de referir que a funcionalização com o APTMS conseguiu resultados melhores. Os filmes revelaram-se mais homogêneos e a quantidade de ouro depositado era significativamente maior. O MPTMS obteve também bons resultados com o banho de ácido

trifluoracético mas não igualou a qualidade obtida com o APTMS. Contudo este resultado foi, de certo modo, surpreendente uma vez que, como foi referido, seria expectável que a o MPTMS tivesse mais sucesso devido à afinidade do ouro com o enxofre.

Relativamente ao banho de nanopartículas, os resultados mais favoráveis foram obtidos com um banho de 6 horas. Banhos mais longos não demonstraram um acréscimo qualitativo considerável que os tornasse mais adequados.

Por último, a própria reação de deposição mostrou ser efetiva em tempos de 5/6 minutos.

Por forma a conseguir obter uma maior homogeneidade dos filmes, pareceu pertinente no decorrer do trabalho ajustar a sua arquitetura do processo. No entanto, este é ainda um aspeto que poderá sofrer melhorias.

A utilização do substrato de vidro teve um maior sucesso na quantidade de ouro que foi absorvida. Como anteriormente referido, levantam-se algumas questões quanto à qualidade dos filmes.

A substituição do vidro pela mica provocou uma menor quantidade de ouro adsorvida, que desde logo compromete a qualidade do filme. Ao contrário de todos os ensaios em vidro, o próprio perfil de absorvância do plasmão de superfície parece pouco visível o que levanta dúvidas se o foi produzido com sucesso.

É, por isso, necessário tentar novas metodologias de funcionalização de modo a promover um aumento da quantidade de ouro do filme e a resistência ao desgaste mecânico.

Deste modo, os próximos passos passariam por conseguir funcionalizar estes filmes e acoplar um tipo de molécula de reconhecimento, como uma enzima ou anticorpos. Além disso, seria importante, depois de concluída esta fase com sucesso, verificar se há alterações nas propriedades elétricas ou óticas, como por exemplo a alteração do ângulo de reflexão, conforme referido no capítulo dos filmes.

# 10. BIBLIOGRAFIA

---

- Abu-Salah, K.M. et al., 2010. Nanomaterials as analytical tools for genosensors. *Sensors*, 10, pp.963–993.
- Ahmed, A. et al., 2012. Investigation on synthesis of spheres-on-sphere silica particles and their assessment for high performance liquid chromatography applications. *Journal of Chromatography A*, 1270, pp.194–203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.008>.
- Altschuh, D., Surface Plasmon Resonance biosensing ( SPR ) Principle and applications Experimental design Kine / cs and affinity Stoichiometry. , 33(0).
- A. N. Shipway, E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem* 2000, 1,18 – 52.
- Aoki, S. et al., 2011. Polyoxometalate (POM)-based, multi-functional, inorganic-organic, hybrid compounds: syntheses and molecular structures of silanol- and/or siloxane bond-containing species grafted on mono- and tri-lacunary Keggin POMs. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 40, pp.1243–1253.
- Asefa, T. & Lennox, R.B., 2005. Synthesis of Gold Nanoparticles via Electroless Deposition in SBA-15. *Communications*, 17(10), pp.2406–2407.
- Bagwe, R.P., Hilliard, L.R. & Tan, W., 2006. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir*, 22(2), pp.4357–4362.
- Baudrand, D. & Bengston, J., 1995. Electroless Plating Processes - Developing Technologies for Electroless Nickel, Palladium and Gold. *Met. Finish*, (September), pp.55–57.
- Blasini, D.R. et al., 2003. Self-assembly of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane on iodine coated gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 540, pp.45–52.
- Boyacı, E. et al., 2011. Synthesis, characterization and application of a novel mercapto- and amine-bifunctionalized silica for speciation/sorption of inorganic arsenic prior to inductively coupled plasma mass spectrometric determination. *Talanta*, 85, pp.1517–1525.
- Buhani et al., 2010. Production of metal ion imprinted polymer from mercapto-silica through sol-gel process as selective adsorbent of cadmium. *Desalination*, 251(1-3), pp.83–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.139>.
- Capobianco, J. a., Shih, W.Y. & Shih, W.H., 2007. 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane As Insulating Coating and Surface for Protein Immobilization for Piezoelectric Microcantilever Sensors. *Review of Scientific Instruments*, 78, pp.15–18.
- Che, G. & Cabrera, C.R., 1996. Molecular recognition based on (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane modified gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 417, pp.155–161.
- Chen, J.-J., Struk, K.N. & Brennan, A.B., 2011. Surface modification of silicate glass using 3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane for thiol-ene polymerization. *Langmuir*, 27, pp.13754–61. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/la202225g>.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 2006; 6: 662-668 [PMID: 16608261 DOI: 10.1021/nl052396o]

- Corazza, M.Z. et al., 2012. Grafting 3-mercaptopropyl trimethoxysilane on multi-walled carbon nanotubes surface for improving on-line cadmium(II) preconcentration from water samples. *Journal of Hazardous Materials*, 243, pp.326–333. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.040>.
- Daghestani, H.N. & Day, B.W., 2010. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors*, 10, pp.9630–9646.
- D'Agostino, A. et al., 2011. Development of nanocomposite based on hydroxyethylmethacrylate and functionalized fumed silica: Mechanical, chemico-physical and biological characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22, pp.481–490.
- De Campos, R.P.S. et al., 2013. Raman imaging spectroscopic characterization of modified poly(dimethylsiloxane) for micro total analysis systems applications. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100, pp.67–71. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.054>.
- Dhawan, A., Canva, M. & Vo-Dinh, T., 2011. Narrow groove plasmonic nano-gratings for surface plasmon resonance sensing. *Optics express*, 19(2), pp.787–813.
- Diener Electronics GmbH. KG, 2007, Plasma Technology, 4<sup>th</sup> Edition; Available at [www.plasma.de](http://www.plasma.de)
- Djokić, S., 2002. Electroless deposition of metals and alloys. *Modern aspects of electrochemistry*, (35), pp.51–133. Available at: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47604-5\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47604-5_2).
- Du, X. & He, J., 2010. Elaborate control over the morphology and structure of mercapto-functionalized mesoporous silicas as multipurpose carriers. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 39, pp.9063–9072.
- Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae* 2011; 3: 34-55 [PMID: 22649683] Eugenii & Willner, I., 2004. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43, pp.6042–6108.
- Grieshaber, D. et al., 2008. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(January), pp.1400–1458.
- G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, London, 1992; Han, H. et al., 2012. Polymeric ionic liquid modified organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1246, pp.9–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.029>.
- Gubala, V. et al., 2013. Simple approach to study biomolecule adsorption in polymeric microfluidic channels. *Analytica Chimica Acta*, 760, pp.75–82. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.030>.
- Homola, J., Yee, S.S. & Gauglitz, G., 1999. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 54, pp.3–15.
- Hrapovic, S. et al., 2003. New strategy for preparing thin gold films on modified glass surfaces by electroless deposition. *Langmuir*, 19(9), pp.3958–3965.
- Huang, H. et al., 2006. Microwave-assisted deposition of uniform thin gold film on glass surface. *Surface and Coatings Technology*, 200, pp.4389–4396.
- Hu, J. et al., 2008. Novel plating solution for electroless deposition of gold film onto glass surface. *Surface and Coatings Technology*, 202(13), pp.2922–2926.

- Ishikawa, K. & Felderhof, B., 1998. Dielectric response in Bloch's hydrodynamic model of an electron-ion plasma. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 250, pp.506–516.
- Irmukhametova, G.S., Mun, G. a. & Khutoryanskiy, V. V., 2011. Thiolated mucoadhesive and PEGylated nonmucoadhesive organosilica nanoparticles from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane. *Langmuir*, 27, pp.9551–9556.
- Jia, J. et al., 2002. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Analytical Chemistry*, 74(9), pp.2217–2223.
- Ju-Wan Lima H. Ahn, K.-T. Rie, J.-J.L., 2003. Mechanical properties of TiNyTiB<sub>2</sub> multilayers deposited by plasma enhanced chemical vapor deposition. *Surface and Coatings Technology*, 174 -175(April 2003), pp.720–724.
- Khdary, N.H. & Howard, A.G., 2011. New solid-phase-nanoscavenger for the analytical enrichment of mercury from water. *The Analyst*, 136, pp.3004–3009.
- Kuo, C.-H. et al., 2011. Effect of surface chemical composition on the surface potential and iso-electric point of silicon substrates modified with self-assembled monolayers. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 13, pp.3649–3653.
- Lei, Y. et al., 2008. Electroless-plated gold films for sensitive surface plasmon resonance detection of white spot syndrome virus. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, pp.1200–1207.
- Liedberg, B., Nylander, C. & Lundström, I., 1995. Biosensing with surface plasmon resonance—how it all started. *Biosensors & bioelectronics*, 10, pp.i–ix.
- Lim, K.-B. & Lee, D.-C., 2004. Surface modification of glass and glass fibres by plasma surface treatment. *Surface and Interface Analysis*, 36, pp.254–258. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/sia.1682>.
- Liu, Y. & Yu, F., 2011. Substrate-specific modifications on magnetic iron oxide nanoparticles as an artificial peroxidase for improving sensitivity in glucose detection. *Nanotechnology*, 22, p.145704.
- M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* 2004, 104, 293 –346.
- Melnik, E. et al., 2011. Multi-step surface functionalization of polyimide based evanescent wave photonic biosensors and application for DNA hybridization by Mach-Zehnder interferometer. *Analytica Chimica Acta*, 699(2), pp.206–215. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.017>.
- Mercier, L. & Pinnavaia, T.J., 1998. Heavy metal ion adsorbents formed by the grafting of a thiol functionality to mesoporous silica molecular sieves: Factors affecting Hg(II) uptake. *Environmental Science and Technology*, 32(18), pp.2749–2754.
- Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, Baxter SC. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Acc Chem Res* 2008; 41: 1721-1730 [PMID: 18712884 DOI: 10.1021/ar800035u]
- Neville, F. et al., 2009. Novel one-pot synthesis and characterization of bioactive thiol-silicate nanoparticles for biocatalytic and biosensor applications. *Nanotechnology*, 20, p.055612.
- Nyamjav, D. & Holz, R.C., 2010. Direct patterning of silanized-biomolecules on semiconductor surfaces. *Langmuir*, 26(23), pp.18300–18302.
- Parra-Alfambra, a M. et al., 2011. New nanostructured electrochemical biosensors based on three-dimensional (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane network. *The Analyst*, 136, pp.340–347.

- Pines, D., 1956. Collective Energy Losses in Solids. *Reviews of Modern Physics*, 28, pp.184–198.
- Pines, D. & Bohm, D., 1952. A collective description of electron interactions: II. Collective vs individual particle aspects of the interactions. *Physical Review*, 85, pp.338–353.
- Piwoński, I. et al., 2005. Investigation of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on Au(111) surface. *Applied Surface Science*, 242, pp.147–153.
- Prarat, P. et al., 2011. Adsorption characteristics of haloacetonitriles on functionalized silica-based porous materials in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 192(3), pp.1210–1218. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.032>.
- Putzbach, W. & Ronkainen, N.J., 2013. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13, pp.4811–4840.
- Ritchie, R., 1957. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. , 106, pp.874 –881.
- Sahoo, B. et al., 2013. A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, pp.280–289. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.003>.
- Seo, J.H. et al., 2011. The use of glass substrates with bi-functional silanes for designing micropatterned cell-secreted cytokine immunoassays. *Biomaterials*, 32(23), pp.5478–5488. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.026>.
- Shun'ko, E. V. & Belkin, V.S., 2007. Cleaning properties of atomic oxygen excited to metastable state  $2s[\sup 2]2p[\sup 4]([(\sup 1]S[\sub 0])]$ . *Journal of Applied Physics*, 102, p.083304. Available at: <http://link.aip.org/link/JAPIAU/v102/i8/p083304/s1&Agg=doi>.
- Tauran, Y. et al., 2013. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World journal of biological chemistry*, 4(3), pp.35–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3746278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tonks, Lewi & Langmuir, I., 1929. Oscillations in Ionized Gases.
- Wang, J. et al., 2005. Electrochemical thinning of thicker gold film with qualified thickness for surface plasmon resonance sensing. *Analytical Chemistry*, 77(17), pp.5760–5765.
- Wu, J. et al., 2013. Surface modification of nanosilica with 3-mercaptopropyl trimethoxysilane and investigation of its effect on the properties of UV curable coatings. *Journal of Coatings Technology Research*, 10(6), pp.849–857.
- Wu, Y.L. et al., 2012. Detecting the effect of targeted anti-cancer medicines on single cancer cells using a poly-silicon wire ion sensor integrated with a confined sensitive window. *Biomedical Microdevices*, 14, pp.839–848.
- Y. Xia, P. Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Mayers, B. Gates, Y. Yin, F. Kim, H. Yan, *Adv. Mater.* 2003, 15, 353 – 389.
- Yang, H. et al., 2011. Investigation of folate-conjugated fluorescent silica nanoparticles for targeting delivery to folate receptor-positive tumors and their internalization mechanism. *International journal of nanomedicine*, 6, pp.2023–2032.
- Yang, S. et al., 2012. One-step interfacial synthesis and assembly of ultrathin luminescent AuNPs/silica membranes. *Advanced Materials*, 24, pp.3218–3222.
- Yang, S.H. et al., 2011. Bioinspired functionalization of silica-encapsulated yeast cells. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50, pp.6115–6118.

- Zhang, N. & Hu, B., 2012. Cadmium (II) imprinted 3-mercaptopropyltrimethoxysilane coated stir bar for selective extraction of trace cadmium from environmental water samples followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 723, pp.54–60. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.027>.
- Zhang, Y., Luo, H.Q. & Li, N.B., 2011. Hydrogen peroxide sensor based on Prussian blue electrodeposited on (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane polymer-modified gold electrode. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, pp.215–221.